STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ANALYSE DER REPLIKATIONSDETERMINANTEN VON RSF 1010 – EIN PLASMID MIT EXTREM BREITEM WIRTSSPEKTRUM

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Scholz
aus Berlin

Berlin 1985

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 821 40 25

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE ANALYSE DER REPLIKATIONSDETERMINANTEN VON RSF1010 - EIN PLASMID MIT EXTREM BREITEM WIRTSSPEKTRUM

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereiches Biologie (23)

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Scholz

aus Berlin

Berlin 1985

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Schuster

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Laskowski

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1985

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1983 bis Juli 1985 in der Abteilung von Herrn Prof.Dr. H. Schuster am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.
Ich möchte mich bei Herrn Professor Schuster bedanken, der die Entstehung dieser Arbeit in seiner Abteilung in großzügiger Weise unterstützte und mir mit Ratschlägen zur Seite stand. Insbesondere bin ich den Herren Dr. E.Scherzinger und Prof.Dr. M.Bagdasarian zu Dank verpflichtet, die durch anregende Diskussionen und fördernde Kritik Wesentliches zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Ferner danke ich Frau Prof.Dr. B.Wittmann-Liebold und Herrn Keith Ashman für die Einführung in die Methoden der Aminosäureanalyse und für die Hilfe im Umgang mit den für Protein-Daten benutzten EDV-Programmpaketen. Für die ständige Hilfsbereitschaft und für verschiedene Anregungen möchte ich Volker Haring und Dr. J.Schnier danken. Die tatkräftige Hilfsbereitschaft von Marion Wassill sei dankend hervorgehoben. Für die bei der Dokumentation dieser Arbeit geleistete Hilfe gilt mein Dank Frau I.Schallehn, Frau E.Philippi, Frau I.Popella und Frau K.Liebing.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	7
Zusammenfassung	8
1. Einleitung	10
1.1. Replikation von Plasmiden	10
1.2. Die Replikationseigenschaften des Plasmids RSF1010	12
1.3. Weitere charakteristische Merkmale des Plasmids RSF1010	14
1.4. Ziel der Arbeit	16
2. Materialien	17
2.1. Nährmedien	17
2.2. Enzyme und Biochemikalien	17
2.3. Bakterienstämme	19
2.4. Plasmide und Bakteriophagen	19
2.5. Lösungen und Puffer	19
3. Methoden	22
3.1. Gewinnung von Plasmid- und Phagen-DNA	22
3.1.1. Isolierung der replikativen DNA-Form (RF-DNA) durch Reinigung der Klarlysate in einem CsCl-Gradienten	22
3.1.2. Schnell-Isolierung kleinerer Mengen der replikativen DNA-Form (RF-DNA) nach einer Lysozym-Hitze-Behandlung der Zellen	23
3.1.3. Präparation von einzelsträngiger DNA (ssDNA) für den Gebrauch als Template	24
3.2. Reinigung von doppelsträngiger DNA aus der Agarose durch Elektro-Elution und anschliessender chromatographischer Reinigung	25
3.3. DNA-Manipulation	26
3.3.1. Erzeugung von Deletionen in der DNA mit Hilfe der Nuklease Bal31	26
3.3.2. Ligation von DNA-Fragmenten	26
3.3.3. Auffüllen von DNA-Fragmenten	27

Seite

3.3.4. Restriktionsenzym-Behandlung von DNA 28
3.4. Elektrophoretische Analyse von DNA 28
3.5. Transformations- und Transfektionsverfahren 29
3.6. Nukleotidsequenzanalyse 30
3.6.1. Herstellung von einzelsträngiger DNA zum Sequenzieren mit Hilfe der M13-Klonierungstechnik 30
3.6.2. Vorgehensweise bei der gerichteten Sequenzierungsstrategie 32
3.6.3. Dideoxysequenzierung mit M13-Vektoren 34
3.6.4. Elektrophoretische Analyse der radioaktiv markierten Oligonukleotide 37
3.6.5. Auswertung von DNA-Sequenzen mit Hilfe von EDV-Programmen 39
3.7. Elektrophoretische Analyse von Proteinen 40
3.8. Aminosäuresequenzanalyse 41
3.8.1. Bestimmung des N-Terminus der Rep-Proteine 41
3.8.2. Bestimmung des C-Terminus der Rep-Proteine 41
3.8.3. Bestimmung der Aminosäurekomposition der Rep-Proteine 42
3.8.4. Auswertung von Aminosäuresequenzen mit Hilfe von EDV-Programmen 43
3.9. Das in vitro-Replikationssystem von RSF1010 43
3.9.1. Herstellung von E.coli-C600-Zellextrakten 43
3.9.2. Test auf DNA-Synthese 44
3.9.3. Quantitative spektrometrische Proteinbestimmung nach der Coomassie-Blue-Methode 45

4. Ergebnisse 46
4.1. Klonierung und Sequenzierung der Replikationsgene repA, B und C 46
4.2. Amino- und Carboxy-terminale Analyse der Replikationsproteine A, B und C von RSF1010 50
4.3. Analyse von offenen Leserahmen und Signalstrukturen in der Nukleotidsequenz 56
4.4. Codongebrauch und Aminosäurezusammensetzung 66

Seite

4.5. Homologievergleiche der Replikationsproteine von RSF1010 mit bekannten Replikationsproteinen und anderen mit der DNA in Wechselwirkung tretende Proteine 75

4.6. Definition der oriV-Region, die als minimales DNA-Segment für die Initiation der RSF1010-Plasmid-Replikation in vitro und in vivo essentiell ist 83

5. Dikussion 93

Literaturverzeichnis 101

Abkürzungen

Ap	Ampicillin
bp	Basenpaare
Brij 58	Polyoxyethylen-20-cetylether
BSA	Rinderserumalbumin
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
O.D.	optische Dichte
PFU	Plaque-bildende Einheiten
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Su	Sulfonamid
tac-Promotor	hybrider trp-lac-Promotor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-galactosid
[ ]	Plasmid-tragender Status oder Plasmid-Koordinaten in kb

ZUSAMMENFASSUNG

Durch eine strukturelle und funktionelle Analyse der Replikationsdeterminanten sollten Erkenntnisse hinsichtlich a.) des molekularen Mechanismus der RSF1010-Replikation, b.) der Regulation der RSF1010-Replikation und c.) der molekularen Ursache für die Erhaltung des RSF1010-Genoms in vielen verschiedenen gram-negativen Bakterien gewonnen werden.

Punkt a.):
Die essentiellen Replikationsdeterminanten des Plasmids RSF1010 wurden durch eine DNA-Sequenzbestimmung in Kombination mit einem RSF1010-spezifischen in vivo- und in vitro-System analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die RSF1010-Replikation in einer 395 bp-größen Region, die man als vegetativen Replikationsursprung (oriV) bezeichnet, initiiert wird. Die 395 bp-große oriV-Region zeichnet sich durch vier gerichtete Sequenzeinheiten von 20 bp (direct repeats) und einen 152 bp-großen Bereich mit einer ausgeprägten Zweifachsymmetrie aus. Beide Domänen werden für einen aktiven Replikationsorigin benötigt. In vivo und in vitro sind für die Initiation der RSF1010-Replikation neben wirtsdeterminierten Replikationsproteinen drei Plasmid-kodierte Replikationsproteine (Rep A, B und C) notwendig. Die Nukleotidsequenz der 3580 bp-großen Region, auf der sich die drei Replikationsgene von RSF1010 befinden, wurde bestimmt. Durch eine N- und C-terminale Aminosäureanalyse der Replikationsproteine konnten die offenen Leserahmen der Replikationsgene von RSF1010 identifiziert werden. Aus der Nukleotidsequenz konnte die Primär- und die mögliche Sekundärstruktur der Replikationsproteine abgeleitet werden. Bestimmte Regionen des RepC-Proteins zeigen eine gewisse Homologie zu konservierten Strukturen von DNA-bindenden Proteinen. Das RepA-Protein weist partielle Homologie mit dem P22-Gen12-Protein auf und das letztere wiederum mit dem dnaB-Protein. Von dem dnaB- und dem P22-Gen12-Protein ist bekannt, daß sie eine DNA-abhängige ATP'ase-Domäne besitzen und an der Prepriming- und Priming Reaktion beteiligt sind.

Punkt b.):
Nach der Promotor- und Transkriptionsterminator-Organisation können Transkripte entstehen, auf denen sich die Informationen einmal für die Replikationsproteine RepA und C und zum anderen für Rep A, B und C befinden. Eine Analyse der offenen Leserahmen der Replikationsgene von RSF1010 zeigt eine Überlappung der Gene repA und C. Auf mRNA-Ebene sind die Initiationssignale von repC durch eine potentielle Sekundärstruktur maskiert, was auf eine mögliche Regulation der Expression auf Translationsebene schließen läßt. Weitere mögliche Mechanismen zur Regulation der rep-Genexpression von RSF1010 werden diskutiert.

Punkt c.):
RSF1010 kodiert für drei Replikationsproteine, die für die eigene Replikation absolut erforderlich sind. Dies läßt vermuten, daß die Replikationsproteine von RSF1010 einige Funktionen von wirtsdeterminierten Replikationsproteinen ersetzen können, was anscheinend die Ursache für den extrem breiten Wirtsbereich von RSF1010 ist. Diese Vermutung konnte durch die Ergebnisse weiterer Arbeiten bestätigt werden (6,11).

1. Einleitung

1.1. Replikation von Plasmiden

Der Lebenszyklus von Plasmiden umfaßt zwei verschiedene Ereignisse, eine Zunahme in der Anzahl (Replikation) und eine Verteilung der Plasmid-Kopien auf die Tochterzellen (Partition) (16). Beide Ereignisse werden kontrolliert durch Plasmid-getragene genetische Informationen. Replikation und Partition sind dabei als unabhängige Prozesse anzusehen, denn Deletionen in der par-Region eines Plasmids beeinflussen nicht die Plasmid-Replikation, aber verursachen eine instabile Vererbung des Plasmids. Damit ist es möglich, die Replikation getrennt von der Partition zu untersuchen.

Plasmid-Replikation wird in der Weise kontrolliert, daß ein Plasmid in einem Bakterienwirt unter gegebenen Bedingungen in einer definierten Durchschnittszahl von Kopien pro Zelle präsent ist. Alle bisher untersuchten Plasmide kontrollieren ihre eigene Replikation durch genetische Informationen, die eine negative Kontrolle ausüben. Nach K.Nordström (16) kann der Haupt-Inhibitor nicht nur ein Protein (λdv (17)) oder eine RNA (CloDF13 (18), pT181 (19), ColE1 (20,21), FII-Plasmide (22,23)) sondern auch eine Serie von gerichteten DNA-Einheiten (RK2 (24,25), R6K (26,27,28,29), P1 (30,31,32), pSC101 (33,34,35) und wahrscheinlich R1162 (RSF1010) (11,36,37)) sein. Ist der Inhibitor eine RNA, so konnte in drei Fällen (ColE1-CloDF13 (18,20), FII-Plasmide (38) und pT181 (39)) gezeigt werden, daß der Inhibitor ausgeprägte Sekundärstrukturen besitzt und mit der komplementären Region eines entgegengesetzten langen Transkripts interagiert. Das Ergebnis ist wahrscheinlich ein RNA-Duplex, der die Konfiguration des längeren Transkripts weiter abwärts verändert. Dies kann zu einer abnehmenden Effektivität der Primer-Aktivität (ColE1-CloDF13) oder der Expression eines Raten-limitierenden Rep-Proteins (FII und pT181) führen. Eine andere große Gruppe von Plasmiden besitzt eine Reihe von gerichteten DNA-Einheiten (direct repeats), die als Inhibitoren ihrer Replikation wirken. Es wird vermutet, daß die gerichte-

ten DNA-Einheiten für die Titration eines Replikations-aktivierenden Faktors (Rep-Protein) verantwortlich sein könnten (P1 (31), R6K (28,29)). Die Expression dieser Plasmid-spezifischen rep-Gene unterliegt in der Regel einer Autoregulation (R6K (29), P1 (32), pSC101 (35)).

Bei dem Plasmid RK2, das in außergewöhnlich vielen gram-negativen Bakterien existieren kann, scheint das Kontrollsystem für die Replikation sogar noch komplizierter zu sein. Zwei Proteine, die korA- und korB-Produkte, interferieren mit der Expression des Replikationsproteins, das durch das trfA-Gen kodiert wird (40,44). Der Wirtsbereich des Plasmids RK2 erfordert in einigen Wirten spezifische Plasmid-kodierte Funktionen, die in anderen Wirten nicht benötigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die meisten Plasmide eine Reihe von Replikationseigenschaften gemeinsam haben. Sie benutzen Wirtssysteme für ihre Replikation. Deshalb sind die Plasmid-vererbten genetischen Informationen, die für die Replikation gebraucht werden, mit einer Größe von 1 bis 3 kb ziemlich klein. Diese genetische Information wird als Basis-Replikon bezeichnet. Ein Basis-Replikon besteht aus einem vegetativen Replikationsorigin (seltener aus 2 bis 3) und in den meisten Fällen aus einem Replikationsgen (weniger häufig aus 2 bis 3). Die Replikationsgene (rep) tragen die Informationen für Proteine, die für die vegetative Replikation absolut erforderlich sind. Diese Proteine sind wahrscheinlich an der Initiation der Replikation beteiligt. Der Initiationsschritt ist der Raten-limitierende Schritt in der Replikation, wobei bei einigen Plasmiden die Replikation durch die Regulation der Expression eines Rep-Proteins kontrolliert wird. Die Replikations-Kontrollfunktionen (cop für Kontrolle der Kopie-Zahl) werden bei mehreren Plasmiden durch DNA-Sequenzen geliefert, die in trans inhibierend auf die Replikation wirken. Eine Analyse führte zur Identifizierung von 3 Typen von Inhibitoren, die kleinere Proteine, kleinere RNA-Moleküle und eine Reihe von gerichteten DNA-Einheiten (direct repeats) sein können. Einen Überblick gibt

die aktualisierte von K.Nordström übernommene Tabelle 1 (16,19,26,32,39,120,121). Dort sind Basis-Replikon-kodierte Funktionen von verschiedenen Plasmiden aufgelistet.

Tabelle 1: Basis-Replikon-kodierte Funktionen von verschiedenen Plasmiden

Plasmid	Größe des Basis-Replikons (kb)	Origin	Cop-Funktionen	Replikations-gene
ColEI	1-1.5	1	RNA I Rop-Protein	keine
RI (F II)	2.5	1	Cop A-RNA Cop B-Protein	repA
pT181	1.5	1	RNA I, II	repC
λdv	2	1	Cro-Protein	O,P
F	1.5	oriV,oriS		repE
R6K	1.6	α,β,γ	π-Protein gerichtete DNA-Einheiten+?	pir
P1	1.2	1	gerichtete DNA-Einheiten+?	repA
RK2	2.5	1		trfA
RSF1010	5.2	1	?	rep A,B,C

1.2. Die Replikationseigenschaften des Plasmids RSF1010

Das Plasmid RSF1010, das einen extrem breiten Wirtsbereich besitzt, benötigt für die eigene Replikation (a) wirtsdeterminierte Replikationsproteine wie die DNA-Gyrase und das Elongationsprotein dnaZ, jedoch nicht die RNA- Polymerase, die Primase, das dnaB-Protein und das dnaC-Protein; (b) drei Plasmid-kodierte Replikationsproteine RepA, RepB und RepC; und (c) eine definierte RSF1010-Region (oriV), in der die vegetative Replikation hauptsächlich initiiert wird (6,10,115). In den Punkten (a) und (b) unterscheidet sich

das Plasmid RSF1010 von den meisten bisher bekannten Plasmiden, deren Abhängigkeit gegenüber den wirtsdeterminierten Replikationsproteinen stärker ausgeprägt ist.

Das heißt, RSF1010 ist unabhängig von bestimmten wirtsdeterminierten Replikationsproteinen, die als Bestandteil eines Proteinkomplexes in der Replikationsgabel des E.coli-Chromosoms operieren. Dieser Proteinkomplex wird Primosom genannt, in dem sich unter anderem die Primase (das dnaG- Protein), das dnaB- und das dnaC-Protein befinden (106,107). Dabei kann die Primase durch das Setzen eines Primers die diskontinuierliche DNA-Synthese des lagging-Strangs und wahrscheinlich auch die kontinuierliche DNA-Synthese des leading-Strangs initiieren (122). Auch kommt die RSF1010-Replikation ohne RNA-Polymerase aus, die bei dem E.coli-Chromosom den Ursprung (Origin) der vegetativen Replikation aktiviert. Die Aktivierung des Origins ist dabei gekoppelt mit der Primer-Synthese durch die Primase (122). Mit Hilfe seiner drei eigenen Plasmid-kodierten Replikationsproteine besitzt RSF1010 die Möglichkeit, einen Plasmid-spezifischen Initiations-Komplex zu bilden, der einen Primer setzt und die Voraussetzungen für die Elongation der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase des Wirts schafft. Dies deutet auf ein einzigartiges Replikationssystem hin und scheint der Schlüssel zu sein für das stabile Existieren von RSF1010 in so vielen verschiedenen gram-negativen Bakterienarten.

Um die molekularen Replikationsmechanismen von RSF1010 in einem in vitro-System untersuchen zu können, wurden die drei Replikationsproteine von RSF1010 zunächst in größerer Menge hergestellt und gereinigt (10,11 und Scherzinger, nicht veröffentlichte Daten). Dazu fand eine Insertion der drei Replikationsgene von RSF1010 in Expressionsvektoren statt, die den regulierbaren starken tac-Hybrid-Promotor tragen. Bei der Überproduktion der RSF1010-Replikationsproteine in E.coli-Stämmen betrug der Anteil des jeweiligen Replikationsproteins ungefähr 5 bis 20% des Gesamtzellproteins. Nach verschiedenen chromatographischen Reinigungen lagen die

jeweiligen Replikationsproteine in hoher Reinheit vor. In einem in vitro-Test erwiesen sich die gereinigten Proteine als aktiv, denn sie initiierten in Anwesenheit einer aus Plasmid-freien Zellen gewonnen E.coli-Enzymfraktion die Replikation des RSF1010-Plasmids spezifisch. Studien mit dem RSF1010-spezifischen in vitro-System und Untersuchungen der DNA-Sequenzorganisation sollen (a) ein besseres Verstehen der molekularen Mechanismen bei der Initiation der RSF1010-Replikation und (b) einen Einblick in die Regulation der RSF1010-Replikation ermöglichen. Erkenntnisse, gewonnen an einfachen Modellsystemen, sind wichtig für das Verstehen des Lebenszyklus des Erbmaterials einer Zelle.

1.3. Weitere charakteristische Merkmale des Plasmids RSF1010

RSF1010 (ähnlich oder identisch mit R300B und R1162) ist ein kleines Plasmid der Escherichia coli Inkompatibilitätsgruppe Q mit einer Größe von 8.7 kb, kommt mit 15 bis 20 Kopien in der Zelle vor und verleiht dem Wirt Resistenz gegen Streptomycin (Sm^r) und Sulfonamid (Su^r) (1,2). RSF1010 kann zwischen verschiedenen Bakterienstämmen durch Mobilisation (Mob^+) übertragen werden, wenn die konjugalen Transfer-Funktionen durch ein Konjugations-fähiges Helfer-Plasmid (Tra^+) geliefert werden (3). Eine detaillierte physikalische und funktionelle Karte des RSF1010-Plasmids, die die Lokalisation einiger Restriktionsendonuklease-Schnittstellen (4,5,6), die RNA-Polymerase-Bindungsstellen (7), die Gene für Streptomycin- und Sulfonamid-Resistenz (2,7,8), die Gene für die Plasmid-Mobilisation (3,9) und Plasmid-Replikation (6,10,11) und den Ursprung (Origin) (12) der vegetativen Replikation beinhaltet, ist in der Abb. 1 zu ersehen.

Als Vertreter von Plasmiden mit breitem Wirtsspektrum hat RSF1010 aus zwei Gründen besonderes Interesse: (a) wegen der Nützlichkeit für den gentechnologischen Gebrauch als Vektor, der nicht nur in Darmbakterien sondern auch in anderen gram-negativen Bakterien erhalten bleibt und (b) wegen der Fähigkeit, stabil in einem breiten Bereich von prokaryonti-

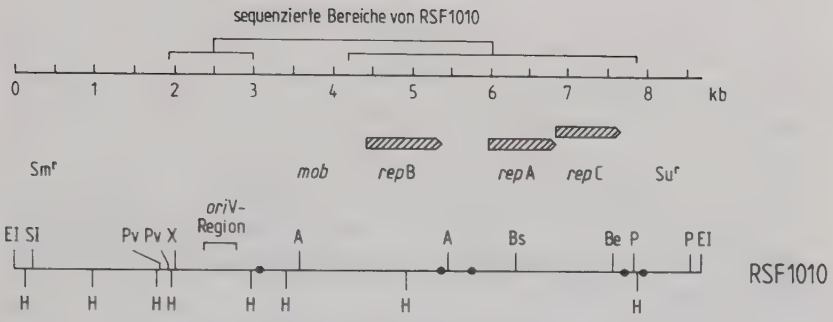


Abb. 1

Physikalische und genetische Karte von RSF1010. Die Koordinaten sind in kb angegeben und haben die einzige EcoRI-Schnittstelle des Plasmids zum Ausgangspunkt. Folgende Restriktionsstellen (4,5,6) sind gezeigt: A, AccI; Be, BstEII; Bs, BssHII; EI, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; SI, SstI; X, XmnI. Von den zahlreichen BssHII-Stellen ist nur diejenige angegeben, die für die Plasmid-Konstruktion relevant war (siehe Ergebnisse, unter 4.3.). Die schwarzen Punkte geben die Bindungsstellen für die E.coli-RNA-Polymerase (7) wieder. Die schraffierten Pfeile zeigen die durch Sequenzierung ermittelten genauen Ausmaße der Replikationsgene repA, B und C sowie deren Transkriptionsrichtung (6,10,11). Die minimale DNA-Region, die für den Start der vegetativen Replikation (12) notwendig ist, ist durch eine Klammer markiert. Ebenfalls angegeben sind die ungefähren Positionen der Resistenzgene Su^r und Sm^r (2,7,8) sowie ein DNA-Bereich (mob) (3,9), der für die Mobilisation des Plasmids benötigt wird.

schen Zell-Typen als Replikon verbleiben zu können (13). Unter Punkt (a) fällt die Konstruktion von Cosmid-Klonierungs-Systemen für die Erstellung von Genom-Bibliotheken (14) sowie die Konstruktion von Expressionsvektoren für die Überproduktion von Proteinen (15), wobei die Erstellung dieser Systeme auf dem RSF1010-Replikon basiert. Weiter sei erwähnt, daß RSF1010 in Bodenbakterien vorkommt, die Kohlenstoff- oder Stickstoff-Quellen verwerten können, die exotische organische Verbindungen wie Naphthalene, Terpene, Alkaloide und synthetische aromatische Verbindungen abbauen können, die Photosynthese ausüben und Stickstoff fixieren können, um nur einige Eigenschaften zu nennen (13). Dies macht ein auf RSF1010-basierendes Klonierungssystem für Bodenbakterien sehr attraktiv.

Um verstehen zu können, welche Genom-Determinanten von RSF1010 den Unterschied zu Plasmiden mit einem sehr eng gesteckten Wirtsbereich ausmachen, ist es wichtig, die Merkmale der DNA-Sequenz-Organisation zu bestimmen, die die Replikation und das Verbleiben des Plasmids in verschiedenen Wirten sichern und kontrollieren.

1.4. Ziel der Arbeit

Durch die Sequenzierung der für die RSF1010-Replikation notwendigen DNA-Regionen sollen die Strukturgene der Replikationsproteine und die Signalstrukturen, die für den Start der vegetativen Replikation und für die Expression der Replikationsgene von Bedeutung sein können, identifiziert werden. Die Replikationsproteine von RSF1010, deren Aminosäuresequenz sich aus der DNA-Sequenz des dazugehörigen Strukturgens ergibt, sollen mit bekannten Replikationsproteinen und DNA-bindenden Proteinen auf strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten verglichen werden. Ferner ist die Bestimmung der minimalen RSF1010-Region, in der *in vivo* und *in vitro* die RSF1010-Replikation initiiert wird, geplant.

2. MATERIALIEN

2.1. Nährmedien

Für das Wachstum von Bakterien wurden zwei Medien benutzt, die die Bezeichnung TY und M9 haben.

Das TY-Medium setzte sich pro Liter aus 10 g Bacto-Trypton Difco, Detroit) und 5 g Bacto-Hefe-Extrakt (Difco, Detroit) zusammen. Für das Gießen von Platten befand sich in dem Liter zusätzlich 15 g Bacto-Agar (Difco, Detroit). Wurde jedoch mit Top-Agar gearbeitet, so betrug die Menge Bacto-Agar nur 6.5 g pro Liter. Mit 1 M NaOH wurde der pH-Wert der TY-Lösung auf 7 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden zusätzlich Thiamin (Sigma, St.Louis) bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml und bei Bedarf Antibiotika hinzugegeben. Zu den gebrauchten Antibiotika gehörten Streptomycinsulfat (Serva), Ampicillin (Bayer), Kanamycin (Sigma) mit einer Endkonzentration im Nährmedium von 100 µg/ml und Chloramphenicol (Sigma) mit 50 µg/ml. Die für das M9-Medium eingesetzten M9-Salze (zweifach konzentriert) enthielten pro Liter 15 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 6 g KH_2PO_4, 1 g NaCl, 2 g NH_4Cl und 0.2 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. Nach dem Autoklavieren wurden in Lösung $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ bis zu einer Endkonzentration von 8 g pro Liter steril hinzugefügt. Für die Herstellung von M9-Platten wurde die M9-Salz-Lösung (zweifach konzentriert) mit einer 3%igen (w/v) Bacto-Agar-Lösung (vorher autoklaviert) in einem Mischungsvolumen 1:1 vermengt.

2.2. Enzyme und Biochemikalien

Für die Klonierungs-Strategien wurden verwendet: verschiedene Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs, BRL (Bethesda Research Laboratories, Inc.) und Boehringer (Mannheim); die T4-DNA-Polymerase, das Klenow-Fragment und die T4-DNA-Ligase jeweils von Biolabs; sowie die Bal31-Nuclease von BRL.

Der Hersteller der Agarose, die für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten benötigt wurde, war Bio-Rad. Die Ribo- und Deoxyribonukleotide von Boehringer und das [Methyl-^{3}H]dTTP von Amersham Buchler (Braunschweig) fan-

den Verwendung in einem RSF1010-spezifischen in vitro-System, in dem die DNA-Synthese gemessen wurde.
Das M13-Sequenzierungsbesteck, in dem sich unter anderem die Deoxyribonukleotide, die Dideoxyribonukleotide, der Oligonukleotid-Primer (dGTAAAACGACGGCCAGT) und das Klenow-Fragment befanden, und das [α^{35}S]dATPαS stammten von Amersham Buchler. Die Carboxypeptidase P für die Bestimmung der Aminosäuren am Carboxy-Terminus von Peptiden wurde von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Die gereinigten Replikationsproteine Rep A, B und C von dem Plasmid RSF1010 wurden freundlicherweise von Herrn Dr. E.Scherzinger zur Verfügung gestellt.
Für verschiedene andere Zwecke wurden folgende Enzyme und Substanzen benutzt: Acrylamid, TEMED und N,N'-Methylenbisacrylamid von Bio-Rad (Richmond); Amberlit MB-1, IPTG, Lysozym, MOPS und RNA'ase von Sigma (St.Louis); Creatin-Kinase, Creatinphosphat und X-Gal von Boehringer (Mannheim); Brij 58, Polyethylenglykol 6000 und SDS von Serva (Heidelberg); Ficoll 400.000 von Pharmacia (Uppsala); sowie Formamid von Merck (Darmstadt). Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

2.3. Bakterienstämme

Tabelle 2: *E.coli* K12-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Quelle
C600	*thr*1 *leu*6 *thi*1 *sup*E44 *lac*	Bachman,1972 (42)
HB101	*hsd*S20 *rec*AB *ava*-14 *pro*A12 *lac*Y1 *gal*K2 *rps*L20 *xyl*5 *mtl*-1 *sup*E44	Boyer et al.,1969(43)
JM101	Δ*lac pro thi sup*E *pro*AB *lacI*^{q} ΔM15 F'*tra* D36	Messing,1983(45)

2.4. Plasmide und Bakteriophagen

Tabelle 3: Plasmide und M13-Phagen

Phage/Plasmid	Phänotyp	Quelle
M13mp8	lac	Messing, 1983 (45)
M13mp9	lac	Messing, 1983 (45)
pMMB2	Km^r	Bagdasarian et al.,1982 (3)
pVH1	Km^r	Haring et al., 1985 (11)
pVH4	Ap^r	Haring et al., 1985 (11)
pVH5	Ap^r	Haring et al., 1985 (11)
RSF1010	Sm^r,Su^r	Guerry et al., 1974 (1)

2.5. Lösungen und Puffer

Bal31-Puffer 12.5 mM $MgSO_4$, 12.5 mM $CaCl_2$, 200 mM NaCl, 1 mM Na_2-EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1)

Brij-Mix	10% (w/v) Brij 58, 4% (w/v) Na-Desoxycholat, 0.06 M Na_2-EDTA, 0.05 M Tris-HCl (pH 8)
Citrat-Puffer	0.2 M Natriumcitrat (pH 2.2)
Entfärbe-Puffer	20% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure
Färbe-Puffer	50% (v/v) Methanol, 9.2% (v/v) Essigsäure, 0.25% (w/v) Coomassie Blue R250
Formamid-Stop-Lösung	0.1% (w/v) Xylencyanol FF, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 10 mM EDTA, 95% (v/v) deionisiertes Formamid (100 ml Formamid wurde für 2-4 Stunden mit 5 g Amberlit MB-1-Ionenaustauscher gerührt und danach filtriert)
MT-Puffer	10 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Nick-Translations-Puffer (10fach konzentriert)	0.5 M Tris-HCl (pH 7.2), 0.1 M $MgSO_4$, 1 mM DTT, 500 µg/ml BSA
PEG-Lösung	20% (w/v) Polyethylenglycol 6000, 2.5 M NaCl
Proteinproben-Puffer (4fach konzentriert)	35% (v/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Mercaptoethanol, 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)
Stop-Lösung I	20% (w/v) Ficoll 400.000, 0.3% (w/v) SDS, 0.07% (w/v) Bromphenolblau in TB-Puffer
Stop-Lösung II	0.5 N NaOH, 0.5% (w/v) SDS, 0.67% (w/v) Na_2-Pyrophosphat, 0.5 mg/ml Kalbsthymus-DNA
Sucrose-Lösung I	25% (w/v) Sucrose, 0.05 M Tris-HCl (pH 8)

Sucrose-Lösung II	20% (w/v) Sucrose, 50 mM Na_2-EDTA, 0.1 M Tris-HCl (pH 8)
TB-Puffer	2.5 M Na_2-EDTA, 90 mM Borsäure, 90 mM Tris-HCl (pH 8.3)
T4-DNA-Polymerase-Puffer (10fach konzentriert)	0.33 M Tris-Acetat (pH 7.9), 0.66 M Kaliumacetat, 0.1 M Magnesiumacetat, 5 mM DTT, 1 mg/ml BSA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM Na_2-EDTA,
TES-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
Transformations-Lösung I	150 mM $MgCl_2$, 10 mM RbCl, 10 mM MOPS (pH 7)
Transformations-Lösung II	50 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl, 100 mM MOPS (pH 6.5)
X-Gal-Lösung	2% (w/v) in N,N-Dimethylformamid
Zellextrakt-Puffer A	100 mM KCl, 1 mM DTT, 25 mM Hepes (pH 8)
Zellextrakt-Puffer B	1 mM p-Aminobenzamidin in Zellextrakt-Puffer A
Zellextrakt-Puffer C	50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM Na_2-EDTA, 25 mM Hepes (pH 8)

3. METHODEN

3.1. Gewinnung von Plasmid- und Phagen-DNA

3.1.1. Isolierung der replikativen DNA-Form (RF-DNA) durch Reinigung der Klarlysate in einem CsCl-Gradienten.

Ausgegangen wurde von einer 800-ml Kultur, die man, wenn es sich um Plasmid-haltige Zellen handelte, über Nacht bis in die stationäre Phase wachsen ließ. Wurde jedoch mit Phagen-DNA gearbeitet, so wurde eine nicht-infizierte Übernachtkultur von Bakterien zunächst in 800 ml flüssigem TY-Medium 1:100 verdünnt. Nach einer Vermehrungsperiode bis zu einer O.D. (λ = 650 nm) von 0.5 wurde die 800 ml-Kultur mit 8 ml einer Phagensuspension (10^{10} bis 10^{11} PFU/ml) infiziert und für weitere 5 Stunden wachsen gelassen. Die Phagen- und Plasmid-haltigen Kulturen wurden nun für 5 Minuten bei 7000 U/Min. abzentrifugiert und in 11 ml Sucrose-Lösung I resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten jetzt im wesentlichen nach der Methode von Clewell und Helinski (46). Nach Zugabe von 1.8 ml Lysozym-Lösung (5 mg/ml, 0.25 M NaCl) und 3.6 ml 0.25 M Na_2-EDTA-Lösung (pH 8.0) wurde das Reaktionsgemisch für 5 Minuten auf Eis gehalten, danach mit 15 ml Brij-Mix versetzt, wobei die Mischung nach ungefähr 5 Minuten auf Eis viskös wurde. War das der Fall, so wurde sie sofort in einem 45Ti-Rotor (Beckman) für 15 Minuten bei 30.000 U/Min. zentrifugiert. Von dem Überstand ("cleared lysate"), der die Plasmid- oder Phagen-DNA enthielt, wurden 32 ml mit 30 g CsCl vermischt, mit 2 ml Ethidiumbromid-Lösung (5 mg/ml) als interkalierendes Agens versetzt und in einem VTi50-Rotor (Beckman) für 20 Stunden bei 45.000 U/Min. und 20°C zentrifugiert. Nach Beendigung der Ultrazentrifugation wurden die Plasmidbanden in den Gradientenröhrchen mit UV-Licht identifiziert. Durch das Anstechen der Gradientenröhrchen am Boden konnte die Plasmid- oder Phagen-DNA-Bande beim Austropfen gezielt erhalten werden. Diese Fraktion wurde mit CsCl-Lösung (1 g CsCl + 1 ml TE-Puffer + 4 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml)) bis zu einem Volumen aufgefüllt, das

dem Innenvolumen des VTi65-Röhrchens (Beckman) entsprach, und ein zweites Mal wurde unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Nach Beendigung der zweiten Reinigung wurde die Plasmid- oder Phagen-DNA wie nach dem ersten Reinigungsschritt erhalten. Nach Entfernung des Ethidiumbromids durch eine dreimalige Extraktion der Lösung mit Isopropanol, das mit TE-Puffer und CsCl gesättigt war, wurde mit dem 3fachen Volumen an Bidest-Wasser verdünnt und danach ein 0.8faches Volumen an Isopropanol hinzugegeben. Die Mischung, die sich in einem silikonisierten Corex 15-Glasröhrchen befand, wurde bei -70°C in flüssigem Stickstoff für 5 Minuten eingefroren und nach dem Auftauen für 15 Minuten bei 15.000 U/Min. in einem mit Adaptern versehenen SS34-Rotor bei 4°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, unter den gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert und nach dem Entfernen der Flüssigkeit unter Vakuum getrocknet. Gelöst wurde der Niederschlag je nach Ausbeute in 150 oder 300 µl TE-Puffer bei 4°C über Nacht. Die Lagerung fand bei -20°C statt.

3.1.2. Schnell-Isolierung kleinerer Mengen der replikativen DNA-Form (RF-DNA) nach einer Lysozym-Hitze-Behandlung der Zellen.

Vorgegangen wurde nach der Vorschrift von Holmes and Quigley (47). Befanden sich in den Zellen Plasmide, so wurde eine 5 ml-Übernachtkultur genommen, die nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 7000 U/Min. in einer 300 µl Sucrose-Lösung II resuspendiert wurde. Für die Herstellung von Phagen-DNA (45) wurde zunächst eine Übernachtkultur von nicht-infizierten Bakterien in 5 ml flüssigem Ty-Medium 1:100 verdünnt. Dann erfolgte eine Infektion, indem ein einzelner Plaque (10^7 bis 10^8 PFU/ml) mit Hilfe einer Glaskapillare aus dem festen Nährmedium herausgestanzt und in die verdünnte 5 ml Bakterienkultur übertragen wurde. Nach einer Wachstumszeit von 5 Stunden wurden die Kulturen in gleicher Weise weiterbehandelt wie bei der Gewinnung von Plasmid-DNA. Nach Abzentrifugation der Zellen, Resuspension in 300 µl Sucrose-Lösung und einer Zugabe von 60 µl Lysozym-Lösung (10

mg/ml Lysozym, 20 mM Na-Acetat, pH 4.6) und 300 µl Triton X-100 (10%ig) wurde das Gemisch bei 100°C für 1 Minute inkubiert. Sofort danach wurden die Proben in Eiswasser abgekühlt und in einem 50Ti-Rotor (Beckman) für 5 Minuten bei 30.000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Gilson-Pipette abgenommen und in ein Eppendorf-Röhrchen (2 ml) übertragen. Gut vermischt mit 0,8 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, pH 7.5) wurde der Überstand zunächst für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren, dann aufgetaut und schließlich für 5 Minuten bei 20.000 U/Min. zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 70%igem (v/v) Ethanol und einer wie vorher durchgeführten Zentrifugation wurde das Präzipitat in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 60 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die mit dem Verfahren erhaltene DNA wurde ausschließlich für die Restriktionsenzym-Analyse und für die Transformation oder Transfektion benutzt.

3.1.3. Präparation von einzelsträngiger DNA (ssDNA) für den Gebrauch als Template. (45)

In einer nicht-infizierten 2 ml-Bakterienkultur mit einer O.D. (λ = 650 nm) von 0.1 wurden zunächst individuelle Plaques mit Hilfe einer sterilen Glaskapillare transferiert. Unter starkem Schütteln wuchsen die infizierten Kulturen für 5 Stunden bei 37°C. Dann erfolgte ein Sammeln der infizierten Kulturen in 2 ml-Eppendorfs und eine Zentrifugation bei 6000 U/Min. für 5 Minuten. Die Zellmasse wurde benutzt für die Isolierung kleinerer Mengen der replikativen DNA-Form des Phagen und ist beschrieben unter 3.1.2. Mit dem verbleibenden Phagen-Überstand wurden neue 2 ml-Eppendorf-Röhrchen gefüllt, in dem sich 200 µl einer PEG-Lösung befand. Nach dem Durchmischen blieb der Überstand bei 4°C über Nacht stehen. Während dieser Zeit wurde die Lösung trübe, und die Phagen konnten durch Zentrifugation bei 10.000 U/Min. für 5 Minuten vom Überstand getrennt werden. Verbleibende Tropfen an PEG-Lösung konnten von der weichen Phagen-Masse durch erneute Zentrifugation und darauffolgendes Abpipettieren abgetrennt werden. Dann wurden die Phagen in einem

Gemisch von 100 µl TES-Puffer und 5 µl SDS-Lösung (10% (w/v)) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei 68°C wurde die Lösung 3mal mit einem 100 µl Gemisch (1:1,v:v) aus Phenol (mit 100 mM Tris-Puffer (pH 8.0) gesättigt) und Chloroform extrahiert, um die Hüllproteine des Phagen zu entfernen. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand, den man nach einer Durchmischung und einer anschließenden kurzen Zentrifugation bei 10.000 U/Min. erhielt, in einem neuen Röhrchen mit 10 µl Natriumazetat (3 M, pH 6) und 250 µl absolutem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C stehengelassen. Der Niederschlag wurde bei 10.000 U/Min. für 10 Minuten abzentrifugiert, dreimal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst. Aufbewahrt wurde die DNA bei -20°C.

3.2. Reinigung von doppelsträngiger DNA aus der Agarose durch Elektro-Elution und anschließender chromatographischer Reinigung

Zuerst wurde das zu isolierende DNA-Fragment elektrophoretisch in einem TB-Agarosegel von anderen DNA-Fragmenten getrennt. Durch Ethidiumbromid in der TB-Agarose konnte die DNA-Bande durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die so lokalisierte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch mit 5 ml 1:2 verdünntem TB-Puffer überführt. In einer horizontalen Elektrophoresekammer, die ebenfalls TB-Puffer mit einer Verdünnung von 1:2 enthielt, wurde die DNA aus dem Agarose-Stück elektrophoretisch eluiert. Das Elektroeluat wurde aus dem Schlauch herauspipettiert und für die chromatographische Reinigung bereitgestellt.

Die chromatographische Reinigung der DNA erfolgte über eine Säule, die man von der Firma Schleicher und Schuell (48) unter der Bezeichnung Elutip-d erhalten hatte. Dabei wurde nach dem Arbeitsprotokoll von Schleicher und Schuell vorgegangen. Nach der chromatographischen Reinigung wurde die DNA in dem Eluat mit Isopropanol gefällt und zuletzt in TE-Puffer gelöst (siehe unter Methodik 3.1.2.).

3.3. DNA-Manipulation

3.3.1. Erzeugung von Deletionen in der DNA mit Hilfe der Nuclease Bal31

DNA der replikativen Form (ca. 37 µg), isoliert nach der Methode von Clewell und Helinski (46), wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten. Bei der RF-DNA handelte es sich ausschließlich um Hybrid-DNA mit einer Größe von ca. 7.5-10 kb, die aus der Phagen-DNA M13mp8 oder M13mp9 und einem insertierten RSF1010-Fragment bestand. Geschnitten wurde unmittelbar neben dem insertierten RSF1010-Fragment in einer Region des Phagen, die nur ein einziges Mal vorkommende Erkennungsstellen verschiedener Restriktionsenyzme besaß. Durch Mischen der Probe mit dem gleichen Volumen Phenol (mit 100 mM Tris-Puffer (pH 8) gesättigt) wurde das Enzym entfernt und somit die Reaktion gestoppt. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase in ein neues Eppendorf-Röhrchen pipettiert und dreimal mit Ether extrahiert. Dann wurde die DNA mit Isopropanol gefällt (siehe unter 2.1.2.). Die lineare DNA wurde in 120 µl Bal31-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst. Gestartet wurde die Exonuclease-Reaktion durch Zugabe von 2 µl Nuclease Bal31 (0.2 Einheiten/µl). Während der Inkubation bei 30°C wurden zu verschiedenen Zeiten 20 µl Aliquots nach den Angaben von Legarski et al. (1978) (49) entnommen. Diese wurden mit 28 µl Na_2-EDTA (20 mM) vermischt, um die Nuclease Bal31 irreversibel zu inaktivieren. Dann folgte eine Behandlung der Proben mit Phenol und eine Fällung der DNA mit Isopropanol. Die mit Deletionen versehene lineare doppelsträngige DNA (ca. 6 µg) wurde in 20 µl TE-Puffer gelöst.

3.3.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Benutzung von M13-Phagen-DNA bestand der 20 µl Ligationsansatz aus (a) 0.1 µg doppelsträngiger M13mp9- bzw. M13mp8-DNA, die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in der für Klonierungszwecke vorgesehenen Polylinker-Region geschnitten war, (b) einem 10 molaren Überschuß an

RSF1010-Insert-DNA zur Phagen-DNA, die in den meisten Fällen auf der einen Seite glatte und auf der anderen Seite überlappende Enden besaß und (c) 0.5 mM ATP, 3 mM DTT, den Komponenten des MT-Puffers und 3 Einheiten T4-DNA-Ligase. Inkubiert wurde bei 14°C über Nacht. Nach einer Verdünnung des Ligationsansatzes von 1:20 wurden Aliquots von 1, 5 und 15 µl für eine Transfektion benutzt.

Für eine Ligation mit Plasmid-Vektoren wurden (a) jeweils die beiden von den Schnittstellen zueinander passenden DNA-Fragmente mit einer Konzentration von jeweils 1 pmol und (b) 0.5 mM ATP, 3 mM DTT, die Komponenten des MT-Puffers und 4 Einheiten T4-DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 µl benutzt. Nach erfolgter Inkubation wie oben beschrieben wurde der gesamte Ansatz für eine Transformation verwendet.

3.3.3. Auffüllen von DNA-Fragmenten

Das Protokoll für das Auffüllen von DNA-Fragmenten wurde von Maniatis et al. (50) übernommen.
Sollten DNA-Fragmente mit überstehenden 3'-Enden aufgefüllt werden, so fand die Reaktion mit der T4-DNA-Polymerase statt. Zu einer DNA-Menge von 2 µg wurden 2 µl T4-Polymerase-Puffer (10fach konzentriert), 13 µl H_2O, jeweils 1 µl der vier dNTP's (2 mM) und 1 µl T4-DNA-Polymerase (4.0 Einheiten/µl) gegeben. Inkubiert wurde bei 37°C für 15 Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch Erhitzen der Probe bei 70°C für 5 Minuten. Danach erfolgte eine Phenolextraktion der Lösung und eine Fällung der DNA mit Isopropanol (siehe unter 3.3.1). Gelöst wurde die getrocknete DNA in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer.

Für das Auffüllen von DNA-Fragmenten mit überstehenden 5'-Enden wurde das Klenow-Fragment der E.coli DNA-Polymerase I benutzt. Zu dem Reaktionsansatz wurden 2 µg DNA, 2 µl Nick-Translations-Puffer (10fach konzentriert), 13 µl H_2O, jeweils 1 µl der vier dNTP's (2 mM) und 1 µl von dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (4 Einheiten/µl) gegeben, 30 Minuten bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe

von 2 µl EDTA (250 mM) gestoppt. Danach erfolgte eine Phenolextraktion. Alle weiteren Schritte wurden ausgeführt wie oben beschrieben.

3.3.4. Restriktionsenzym-Behandlung von DNA

Bei der Benutzung der Restriktionsenzyme EcoRI, PstI, BamHI, AccI, PvuII, EcoRV und SmaI wurden die vom Hersteller genannten Reaktionsbedingungen übernommen. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der geschnittenen DNA wurde der 50 µl Reaktionsansatz mit 1/5 Volumen Stop-Lösung I versetzt. Wurde DNA (ca. 0.3 µg) aus dem Verfahren von Holmes und Quigley (47) einer Restriktionsanalyse in einem Volumen von 50 µl unterworfen, so wurde nach der Verdauung das Reaktionsgemisch zunächst mit 2 µl RNAase (50 µg/ml gelöst in einer 10 M Kalium-Azetat-Lösung (pH 5.5) und erhitzt für 5 Minuten bei 100°C) für 5 Minuten behandelt. Erst dann erfolgte die Zugabe von 1/5 Volumen Stop-Lösung I.

3.4 Elektrophoretische Analyse von DNA

Für die Analyse von DNA-Fragmenten und für die präparative Reinigung von DNA wurden überwiegend 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dafür wurden 2 g Agarose in 200 ml TB-Puffer durch Erhitzen in einem Mikrowellenherd gelöst und nach dem Abkühlen auf 60°C mit EtBr bis zu einer Endkonzentration von 0.5 µg/µl versetzt. Das flüssige Gel wurde auf einen waagerechten abgedichteten Sockel gegossen und befand sich zwischen zwei Pufferkammern. Die Konstruktionsmaße stammten aus dem Mitsubishi-Kasei-Institute of Life Science (persönliche Mitteilung) und von Maniatis et al. (50), wobei zwei Versionen zur Anwendung kamen. Bei der ersten Version besaß das horizontale Gel eine Länge von 6.5 cm, eine Breite von 13.5 cm und 14 Taschen mit einem Aufnahmevolumen von jeweils 30 µl. Die zweite Version unterschied sich von der ersten Version lediglich in der Länge von 15 cm. Nach einer etwa einstündigen Polymerisation wurden die beiden Kammern mit TB-Puffer gefüllt, bis das Gel mit Puffer bedeckt war. Die Elektrophorese erfolgte für das kürzere Agarosegel bei einer Spannung von 80V für 1.5 h und für das längere Agaro-

segel bei 150V für 3 h. Das kürzere Gel wurde überwiegend benutzt für die Prüfung der Reinheit und der Konzentration von DNA. Das längere Gel fand Verwendung für die analytische Auftrennung und für die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten. Nach vollendetem Elektrophoreselauf wurde die mit EtBr gefärbte DNA mit kurzwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und für die Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera (Typ MP4) auf einem Polaroid-Film (Typ 665 oder 667) fotografiert. Dabei wurde ein Rotfilter von B+W (Wiesbaden) benutzt.

Um die Größe der DNA-Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese zu bestimmen, wurden λ-Standard-DNA-Präparate verwendet. Die λ-DNA wurde entweder mit HindIII oder mit HindIII und EcoRI geschnitten (52).
Für eine quantitative Bestimmung von DNA fand ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zwischen Probe und Standardverdünnungen statt, nachdem die mit EtBr gefärbten DNA-Banden durch kurzwelliges UV-Licht zur Fluoreszenz gebracht wurden.

3.5. Transformations- und Transfektionsverfahren

Unter Transfektion versteht man die Infektion von Bakterien mit Phagen-DNA. Die Durchführung ist ähnlich dem Transformationsverfahren mit Plasmid-DNA nach Kushner (53). Für eine Transfektion wurde der Stamm JM101 und für eine Transformation der Stamm HB101 bzw. C600 kompetent gemacht. Zuerst wurden aus einer 3 ml-Übernachtkultur 0.3 ml entnommen und in 10 ml TY-Medium überführt. Nach dem Erreichen einer $O.D._{650}$ von 0.35 wurde die Bakterien-Suspension für 5 Minuten bei 7000 U/Min. und 4°C abzentrifugiert. Resuspendiert wurde vorsichtig in 3 ml einer eiskalten Transformations-Lösung I. Nach wiederholtem Zentrifugieren unter den gleichen Bedingungen wie vorher wurden die Zellen mit 3 ml einer eiskalten Transformations-Lösung II vermischt, 30 Minuten im Eis stehengelassen, 5 Minuten bei 7000 U/Min. und 4°C zentrifugiert, und das Pellet mit 2 ml eiskalter Transformations-Lösung II und 30 µl DMSO vermengt. Davon wurden 200 µl kompetente Zellen entweder in eine 0.5 bis 1 µg Plasmid-DNA-

Lösung oder in eine 0.2 bis 0.5 ng Phagen-DNA - Lösung gegeben, 45 Minuten bei 4°C, und anschließend eine Minute bei 42°C inkubiert.

Lagen in den Zellen Plasmide vor, dann wurden 3 ml TY-Medium zugegeben und 2 Stunden bei 37°C zur Expression der erworbenen Eigenschaften inkubiert. Zum Schluß wurde von dem Gemisch 0.1 ml zur Selektion von Transformanten auf Antibiotika-haltigem TY-Agar ausplattiert.

Trugen die Zellen jedoch M13-Phagen, so wurde nach dem Hitzeschock (42°C) eine 0.2 ml frische nicht-infizierte JM101-Kultur ($O.D._{650}$ 0.5), 10 µl IPTG (100 mM), 50 µl X-Gal-Lösung und 3 ml TY-Top-Agar zugegeben (45). Nach kurzem Vermischen wurde der gesamte Inhalt auf eine TY-Agar-Platte gleichmäßig verteilt. Nach dem Erkalten des TY-Weichagars wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 7 Stunden konnten blaue und farblose Plaques unterschieden werden.

3.6. Nukleotidsequenz analyse

3.6.1. Herstellung von einzelsträngiger DNA zum Sequenzieren mit Hilfe der M13-Klonierungstechnik

Das Flußdiagramm in Abb.2 veranschaulicht den Arbeitsverlauf der Klonierung überlappender, in der Größe variierender DNA-Fragmente bis zur Herstellung von hybrider einzelsträngiger DNA, in der sich die zu sequenzierende DNA-Sequenz befindet. Dem Flußdiagramm von oben nach unten folgend wurde zuerst eine Fragment-Familie der unbekannten DNA-Sequenz erzeugt. Dazu wurde das zu sequenzierende Fragment aus dem Plasmid RSF1010 mit Hilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten und präparativ isoliert. Von diesem RSF1010-Fragment wurden überlappende fortschreitend kleiner werdende Inserts mit der Nuclease Bal31 angefertigt (siehe unter 3.3.1. und 3.6.2). Dieser Satz von Inserts wurde in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Phagen M13 in der Weise eingesetzt, daß die deletierte Region in unmittelbarer Nachbarschaft der M13-Primer-Stelle war. Dieser Ligationsansatz

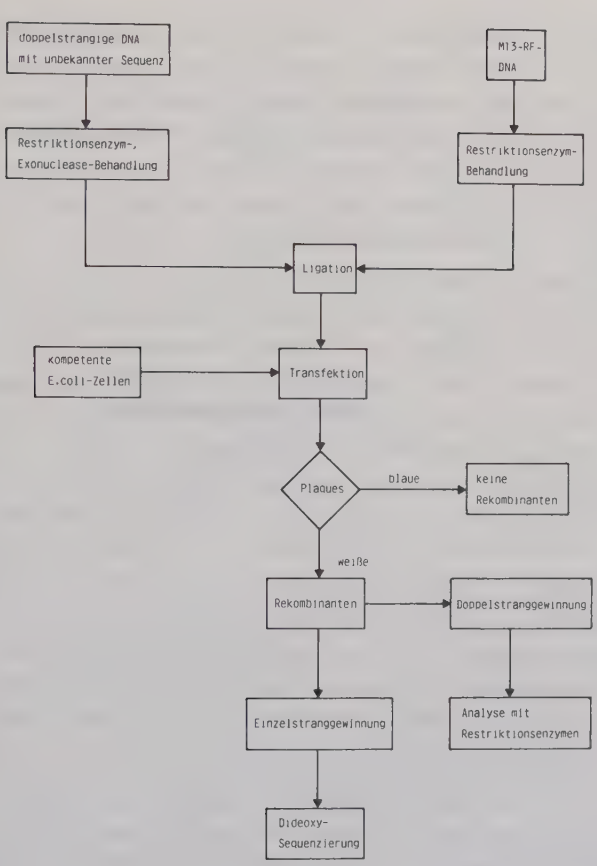


Abb. 2

Flußdiagramm zur Herstellung einzelsträngiger DNA-Substrate für die DNA-Sequenzierung.

wurde für die Transfektion von JM101-E.coli-Zellen benutzt. Das Ergebnis der Transfektion waren entweder blaue oder weiße Plaques, die auf die Nicht-Inaktivierung oder Inaktivierung eines lac-Operon-Markers zurückzuführen waren. Das heißt alle weißen Plaques enthielten überwiegend insertierte Fremd-DNA in der lac-Region des Phagen-Vektors, was zu einer Inaktivierung der α-Komplementation führte (45).

Bei der intakten α-Komplementation konnte die durch IPTG induzierte ß-Galactosidase das Lactose-Analog X-Gal spalten, wodurch ein blauer Farbstoff (Bromochloroindol) entstand. Eine Inaktivierung der α-Komplementation führte zum Ausfall der oben genannten Reaktion, und es entstanden weiße Plaques. Als Wirt für die Phagen-Infektion wurden F^+-Bakterien (E.coli JM101-Zellen) verwendet, die durch den F-Faktor F-Pili bei einer Temperatur von 37°C bilden konnten. Diese F-Pili benötigten die M13-Phagen für die Adsorption an die Wirtszelle. In dem Wirt selber lag die DNA durch einen Umwandlungsprozeß als doppelsträngige RF-DNA vor. Die Bakterien werden nicht, wie dies bei anderen Phagen der Fall ist, lysiert, sondern wachsen mit verminderter Geschwindigkeit weiter. Daher sind die Plaques in Wirklichkeit nur verminderte Wachstumszonen von Bakterien.

Wie aus dem Flußdiagramm weiter zu ersehen ist, wurden die farblosen Plaques dazu benutzt, einzelsträngige (siehe unter 3.1.3.) und doppelsträngige DNA (siehe unter 3.1.2.) zu gewinnen. Nach einer Restriktionsanalyse der doppelsträngigen DNA wurden die entsprechenden Einzelstränge für die Dideoxysequenzierung verwendet, bei denen eine fortschreitend kleiner werdende Insert-Größe zu erkennen war.

3.6.2. Vorgehensweise bei der gerichteten Sequenzierungsstrategie

Die gerichtete Sequenzierungsstrategie (54) mit Hilfe der Nuclease Bal31 wird in Abb.3 wiedergegeben. Zuerst wurde die doppelsträngige replikative DNA-Form der Phagen M13mp8 oder M13mp9 mit Restriktionsenzymen in der Klonierungsregion geschnitten. Dann wurde das zu sequenzierende Fragment in die

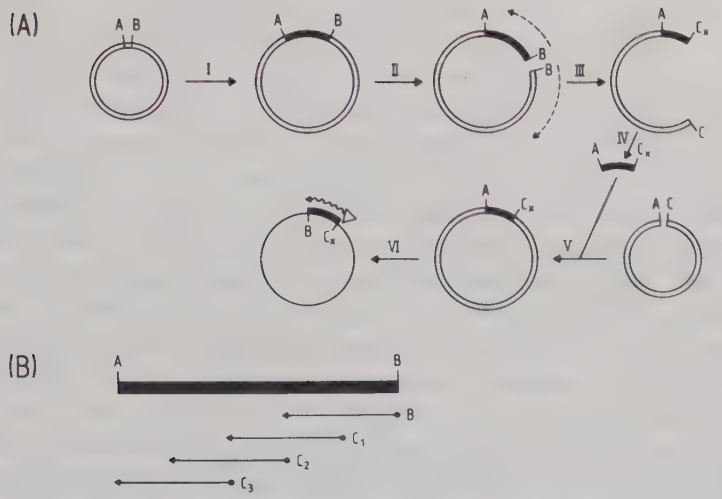


Abb. 3

Konstruktion einer Population von Deletionsderivaten für die gerichtete DNA-Sequenzierung. (A) Schritt I: Das zu sequenzierende DNA-Fragment (dick ausgefüllte Linie) wird zwischen den nur je einmal vorkommenden Schnittstellen A und B des M13-Vektors insertiert. Schritt II: Nach Linearisierung an der Schnittstelle B werden durch Verdauung mit der Nuklease Bal31 verschieden große Deletionen (gestrichelter Pfeil) in der doppelsträngigen chimären Phagen-DNA erzeugt. Schritte III und IV: Durch Spalten an der Schnittstelle A kann das Bal31-induzierte Spektrum an Inserts vom geschädigten Vektor getrennt und isoliert werden. Schritt V: Die verschieden großen Inserts innerhalb einer Population zeichnen sich durch ein Bal31-erzeugtes glattes (C_x) und ein Restriktionsendonuklease-erzeugtes Ende (A) aus; sie können deshalb gerichtet in einem intakten M13-Vektor subkloniert werden, so daß die Primer-Stelle in unmittelbarer Nähe des glatten Endes des C_x liegt. Schritt VI: Die isolierte einzelsträngige DNA des rekombinanten Phagen hybridisiert mit dem Primer (offenes Dreieck) außerhalb der Klonierungsstelle und ermöglicht eine DNA-Synthesereaktion (wellenförmiger Pfeil) in Richtung des insertierten DNA-Fragments. (B) Anhäufung von Daten bei der gerichteten Sequenzierung. Durch geeignete Wahl von Rekombinanten mit immer größer werdenden Deletionen kann die Sequenz mit einem Minimum an Klonen bestimmt werden. Aufgrund der von einem Ende des Fragments ausgehenden Deletionen (das Ende der Deletion ist durch einen Punkt gekennzeichnet) wird die Sequenz nur in einer Richtung gelesen (Ausmaß und Richtung sind durch einen Pfeil angegeben). Dieser Prozeß kann mit dem ursprünglichen DNA-Insert in der anderen Orientierung wiederholt werden, wobei die Sequenz des Komplementärstranges erstellt wird.

entsprechende Erkennungsstelle des Phagen-Vektors durch Ligation insertiert. Nach erfolgter Transfektion und Isolierung der RF-DNA aus den infizierten Zellen wurde die zirkulare rekombinante DNA in unmittelbarer Nähe des Inserts durch ein nur ein einziges Mal schneidendes Restriktionsenzym linearisiert. Infolge einer fortschreitenden Nuclease-Verdauung mit Bal31 wurden Deletionen an den Enden dieser Moleküle erzeugt. Die verbleibende Insert-DNA wurde durch erneutes Schneiden von dem durch Deletionen verkürzten Vektor abgetrennt. Durch ein präparatives Gel wurden die verkürzten Insert-Moleküle Größen-fraktioniert und dementsprechend aus der Agarose isoliert(siehe dazu Abb.5). Dann erfolgte ein Einsetzen der verschiedenen Größen-Fraktionen an Insert-DNA in die Klonierungsstelle des Phagenvektors, eine Transfektion und die Präparation von einzelsträngiger rekombinanter Phagen-DNA. Aufgrund der bekannten Lage und Größe der jeweiligen Insert-Fraktion konnte die Sequenz mit einem Minimum an Klonen bestimmt werden.

3.6.3. Dideoxysequenzierung mit M13-Vektoren

Wie in der Abb.4 zu erkennen ist, wurde die DNA-Sequenzierung mit Deoxy/Dideoxy-Nukleotiden durchgeführt (45,55). Die Sequenzierung durch geprimte, enzymatische Synthese kann als Protokoll wie folgt geschrieben werden.
Für die Annealing-Reaktion bestand der Ansatz aus:
7.5 µl einzelsträngiger Template-DNA (ca. 0.7 µg; ca. 7.500-10.000 Nukleotide lang), 1 µl M13-Primer (ca. 1.2 ng; 17 Nukleotide lang) und 1.5 µl Klenow-Reaktions-Puffer. Die Annealing-Reaktion fand für 2 Stunden bei 56°C in einem 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen statt. Kondenströpfchen, die sich an dem Eppendorf-Deckel bildeten, wurden alle 20 Minuten abzentrifugiert. Entweder wurde mit dem Gemisch sofort weitergearbeitet, oder es wurde bei -20°C aufbewahrt.

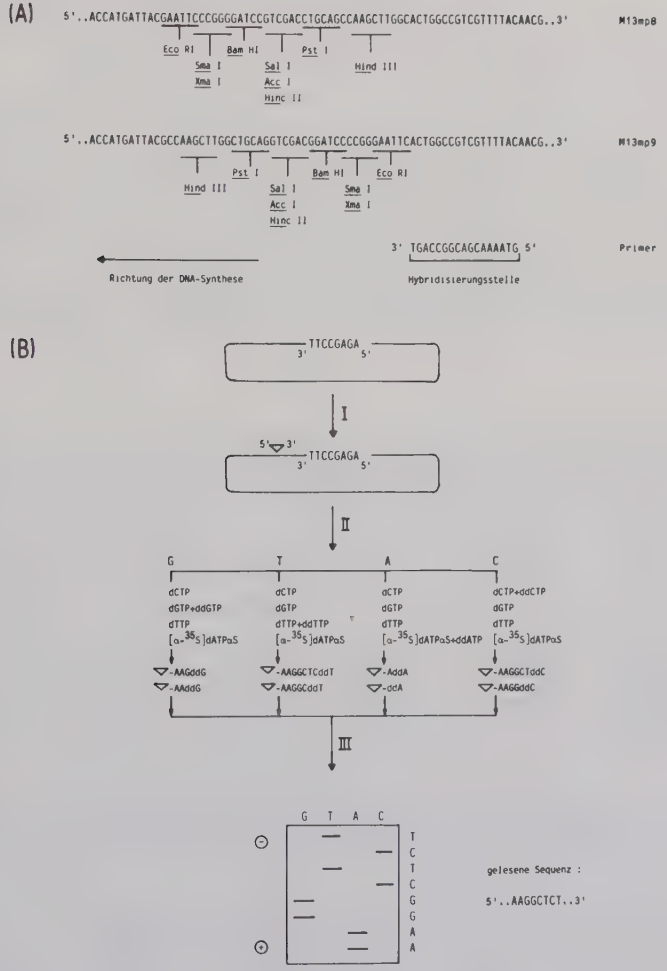


Abb. 4

(A) Klonierungsregionen der Phagen-Vektoren M13mp8 und M13mp9 mit den verschiedenen, nur einmal vorkommenden Restriktionsstellen. Da die Klonierungsstellen in der lac-Region liegen, führen Insertionen zu einem Ausfall der α-Komplementation in der Wirtszelle (siehe Text). Durch einen Indikator kann der Ausfall der α-Komplementation angezeigt werden, wodurch sich Vektoren mit Inserts von solchen ohne Inserts unterscheiden lassen. Die Hybridisierungsstelle

des 17 Nukleotide langen Primers liegt in unmittelbarer Nähe der Klonierungsregion. Die Richtung der DNA-Synthese während der Sequenzierungsreaktion ist durch Pfeil angegeben.

(B) Dideoxysequenzierung mit dem M13-System. Schritt I: Die chimäre einzelsträngige Phagen-DNA mit dem zu sequenzierenden DNA-Segment wird mit dem Primer (offenes Dreieck) versetzt. Schritt II: Das Template-Primer-Gemisch wird auf vier Reaktionsansätze verteilt, die unter anderem jeweils einen der vier verschiedenen Elongationsinhibitoren (ddGTP, ddTTP, ddATP oder ddCTP) enthalten (siehe Text). Schritt III: Nach erfolgter Reaktion werden die radioaktiv markierten Oligonukleotide der vier verschiedenen Reaktionsansätze in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Während dieser Zeit wurden die weiteren Reagentien für die Sequenzierungsreaktion zusammenpipettiert. Das Pipettier-Schema für die dNTP-Gemische wurde in vier Spalten unterteilt.

	A°	C°	G°	T°
0.5 mM dCTP	20 µl	1 µl	20 µl	20 µl
0.5 mM dGTP	20 µl	20 µl	1 µl	20 µl
0.5 mM dTTP	20 µl	20 µl	20 µl	1 µl
TE-Puffer	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Diese vier Gemische wurden in die jeweiligen ddNTP-Lösungen gegeben und ergaben vier verschiedene Ansätze.

25 µl A° + 25 µl ddATP (0.1 mM) = A°/ddATP-Gemisch
25 µl C° + 25 µl ddCTP (0.1 mM) = C°/ddCTP-Gemisch
25 µl G° + 25 µl ddGTP (0.3 mM) = G°/ddGTP-Gemisch
25 µl T° + 25 µl ddTTP (0.5 mM) = T°/ddTTP-Gemisch

Nachdem alle Lösungen fertiggestellt waren, wurde zu dem 10 µl Primer/Template-Komplex 1.5 µl [α-^{35}S]dATPαS (10 µCi/µl; ca. 600 Ci/mmol) (56) und 1 µl von dem Klenow-Fragment (1 Einheit/µl) hinzugegeben. Aus diesem Reaktionsgemisch wurden jeweils 2.5 µl in vier 1.5 ml-

Eppendorf-Röhrchen gegeben, in denen sich 2 µl der entsprechenden dNTP/ddNTP-Gemische befanden.

Röhrchen G: 2.5 µl Template/Primer/radioaktiver Marker/ Enzym-Gemisch + 2 µl G^{o}/ddGTP
Röhrchen T: 2.5 µl Template/Primer/radioaktiver Marker/ Enzym-Gemisch + 2 µl T^{o}/ddTTP
Röhrchen A: 2.5 µl Template/Primer/radioaktiver Marker/ Enzym-Gemisch + 2 µl A^{o}/ddATP
Röhrchen C: 2.5 µl Template/Primer/radioaktiver Marker/ Enzym-Gemisch + 2 µl C^{o}/ddCTP

Nach Durchmischung und kurzer Zentrifugation erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei 30°C. Dann wurden 2 µl einer Mischung (Chase-Lösung) aus allen 4 dNTP's (jeweils 0.5 mM) in die vier Röhrchen übertragen. Es folgte eine weitere Inkubation von 15 Minuten bei 30°C. Gestoppt wurde mit 4 µl einer Formamid-Stop-Lösung. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt, wenn sie nicht sofort elektrophoresiert wurden. Die Vorschrift und die dazu benutzten Reagentien wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) übernommen.

3.6.4. Elektrophoretische Analyse der radioaktiv markierten Oligonukleotide

Benutzt wurde ein DNA-Sequenzierungsgel-System, daß von W.Ansorge entwickelt wurde (57). Die Teile für das System wurden bezogen von LKB (Bromma, Schweden) (58). Das Gel wurde mit einer Gleit-Gieß-Technik (57) hergestellt. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Spacer einen Abstand von 0.2 mm voneinander hatten. Beim Gießen war die untere Platte eine thermostatisierte Platte und die obere eine Ohrenplatte (200 x 550 x 4 mm). Vor dem Gießen wurde die Ohrenplatte mit 5 ml einer Bind-Silan-Lösung behandelt, die sich aus 25 ml absolutem Ethanol, 75 µl Bind-Silan (γ-Methacryloxypropyltrimethoxy-Silan) und 750 µl einer 10%igen (v/v) Essigsäure-Lösung zusammensetzte. Durch

die Beschichtung wurde das Acrylamidgel kovalent an das Glas gebunden. Die thermostatisierte Platte wurde mit 5 ml Repel-Silan-Lösung (eine 2%ige Lösung von Dimethyldichlorosilan in 1,1,1-Trichlorethan) eingerieben. Aufgrund dieser Behandlung konnte sich das Polyacrylamidgel leichter von der thermostatisierten Platte lösen. Die Konzentration der Polyacrylamidgel-Lösung betrug 6% und bestand aus 50 g Harnstoff, 15 ml einer 40%igen Acryl/2%igen Bisacrylamid-Lösung und 10 ml TB-Puffer (10fach konzentriert) in einem mit H_2O aufgefüllten Volumen von 100 ml. Nach dem Lösen und Entlüften unter einem Wasserstrahlvakuum wurde das Gemisch mit 700 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Lösung versetzt. Gestartet wurde die Polymerisation mit 50 µl TEMED.

Nach einer Polymerisationszeit von 1 Stunde wurden die Glasplatten mit dem polymerisierten Gel in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur von LKB befestigt. Die Kammern wurden mit TB-Puffer gefüllt und der Kamm entfernt. Das zirkulierende Wasser in der thermostatisierten Platte wurde bis zu einer Temperatur von 50 oder 70°C aufgewärmt. Ein Temperatur von 70°C ermöglichte eine Auflösung der Oligonukleotide, die in einem konventionellen Gel-Elektrophorese-System einer Kompression unterliegen würden. Aus diesem Grund wurde jede Probe einer Elektrophorese bei 50 und 70°C unterzogen (siehe dazu Abb.28). Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben, die sich in einer Formamid-Stop-Lösung befanden, für 2 Minuten bei 95°C erhitzt, und anschließend die Taschen mit 2 µl der DNA-Proben beladen. Elektrophoresiert wurde bei einer Spannung von 2500 V.

Nachdem die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gewandert war, wurden die Platten mit dem Gel aus der Apparatur genommen und mit Hilfe eines Spatels getrennt. Das Polyacrylamidgel blieb an der Ohrenplatte, die mit einer Bind-Silan-Lösung behandelt war, fest haften und wurde mit dieser für 15 Minuten in eine 10%ige (v/v) Essigsäure-Lösung gelegt. Nach der Fixierung wurde das Gel für 2 Stunden bei 60°C getrocknet und danach autoradiographiert. Für die Autoradiographie wur-

de ein Fuji-Film direkt auf das getrocknete Gel gelegt, mit Klammern an der Glasplatte befestigt, und für ca. 24 Stunden in einem Expositions-Kasten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde der Film entwickelt und fixiert.

Für das Entfernen des kovalent gebundenen Gels von der Ohrenplatte wurde die Glasplatte mit dem gebundenen Gel für etwa 24 Stunden in einer 0.5-1 M NaOH-Lösung liegengelassen. Dann erfolgte ein Waschen der Glasplatte mit deionisiertem Wasser und zuletzt mit Ethanol.

3.6.5. Auswertung von DNA-Sequenzen mit Hilfe von EDV-Programmen

Das Hantieren mit unbekannten DNA-Sequenzen wurde unterstützt durch die Computer-Programme DATBAS und NUCDAT (59). Im Programm DATBAS wurden unter anderem anfallende DNA-Sequenzen, die sich aus der Dideoxysequenzierung mit dem M13-System ergaben, auf überlappende homologe DNA-Sequenzen überprüft, um daraus eine Consensus-Sequenz zu erstellen. Im Programm NUCDAT wurden DNA-Sequenzen auf Signalstrukturen wie Promotoren, DNA-Bereiche mit ausgeprägter Zweifachsymmetrie und sich wiederholende gerichtete DNA-Sequenzen untersucht. Ferner wurden in dem Programm Translationsstart- und Translationsstop-Signale abgefragt, die sich im gleichen Leserahmen (reading frame) befanden. Das Ergebnis waren offene Leserahmen (open reading frames), die die Informationen für hypothetische Proteine tragen konnten. Weitere Unterprogramme wie Codon-Gebrauch, Molekulargewicht der hypothetischen Proteine, Basen-Komposition, Übersetzung der Tripletts von offenen Leserahmen in Aminosäuren und Restriktionsenzym-Erkennungsstellen waren in dem Programm-Menü zu finden. Die Fortran-Programme wurden ausgeführt auf einem DEC-10 Computer.

3.7. Elektrophoretische Analyse von Proteinen

Es wurde eine vertikale Slab-Gel-Apparatur nach Studier (60) benutzt. Zwischen zwei Glasplatten (140 x 160 x 2.5 mm), die durch Spacer einen Abstand von 1.5 mm zueinander hatten, wurde das Gel gegossen. Für die Vorbereitung des Trenn- und des Sammel-Gels wurden zwei Stamm-Lösungen hergestellt (61). Die Stamm-Lösung I bestand aus 44 g Acrylamid und 0.8 g Bisacrylamid und die Stamm-Lösung II aus 30 g Acrylamid und 0.8 g Bisacrylamid. Beide Lösungen wurden auf ein Volumen von 100 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.
Bei Gebrauch eines 15%igen Gelsystems befanden sich in dem Trenn-Gel 6.8 ml Stamm-Lösung I, 0.4 ml 10%ige (w/v) SDS-Lösung, 5 ml 1.5 M Tris-HCl-Lösung (pH 8.8), 7.8 ml Bidest-Wasser, 50 µl 10%ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung und 40 µl TEMED. Im Sammelgel waren 0.83 ml Stamm-Lösung II, 0.05 ml 10%ige (w/v) SDS-Lösung, 1.25 ml 0.5 M Tris-HCl-Lösung (pH 6.8), 2.86 ml Bidest-Wasser, 12 µl 10%ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung und 10 µl TEMED. Vor dem Gießen und dem Polymerisieren wurden die Lösungen entgast. Gestartet wurde die Polymerisation durch die Zugabe von TEMED. Beide Elektroden-Puffer enthielten 0.0025 M Tris-HCl (pH 8.3), 0.19 M Glycin und 0.1% (w/v) SDS.

Für die Präparation der Proteinproben wurden zentrifugierte Zellen einer 1 ml-Kultur ($O.D._{650\ nm} = 1$) in 40 µl Proteinproben-Puffer resuspendiert. Das Gemisch wurde zuerst für 5 Minuten bei 50°C, dann für 2 Minuten bei 100°C erhitzt und danach für 5 Minuten bei 20.000 U/Min. zentrifugiert. Aliquots (25 µl) des Überstandes wurden in den Taschen eines 15%igen SDS-Polyacrylamid-Slab-Gels aufgetragen und über Nacht bei 30 Volt elektrophoresiert wie bei Lugtenberg beschrieben (61). Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn der Farbstoff den Gelfuß erreicht hatte. Das Gel wurde unter leichtem Schütteln in Färbe-Puffer für etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur angefärbt, anschließend in einem Entfärbepuffer für etwa 2 Tage bei Raumtemperatur entfärbt und in 7%iger (v/v) Essigsäure-Lösung aufbewahrt.

3.8. Aminosäuresequenzanalyse

3.8.1 Bestimmung des N-Terminus der Rep-Proteine

Die Protein-Fraktionen wurden über Nacht bei 4°C gegen 500 ml einer H_2O/Essigsäure-Lösung (ca. $1:10^5$, v:v; pH 4.3) dialysiert. Für den automatisierten Edman-Abbau wurden etwa 15 nmol des Polypeptids benutzt, wobei die Kopplung des Polypeptids mit Phenylisothiocyanat (PITC), die Spaltungsreaktion und die Isomerisation der freigelassenen Thiazolinone in stabilere Phenylthiohydantoin-Derivate (PTH-Aminosäuren) in einer Flüssigkeits-Phasen-Maschine stattfand. Dann wurden die vom Sequenzer freigesetzten PTH-Aminosäuren in 100 µl 20%igem (v/v) Methanol gelöst, wovon 1/4 Volumen in eine Umkehrphasen-HPLC-Säule (250 x 4 mm; selbstgestopft mit Spherisorb C8 3µ von Phase Separation Ltd.) injiziert wurde. Nach dem isokratischen Säulenlauf erfolgte eine Registrierung der freigesetzten PTH-Aminosäuren bei den vom Detektor erzeugten Wellenlängen von 254 und 312 nm auf einem Zwei-Kanal-Schreiber. Die derivatisierten Aminosäuren Threonin und Serin können nur bei den Wellenlängen 312 nm, nicht aber bei 254 nm detektiert werden. Alle Reagentien, technischen Details und Vorschriften sind ausführlich zu finden bei Wittmann und Ashman (62).

3.8.2. Bestimmung des C-Terminus der Rep-Proteine

Von einer dialysierten Protein-Fraktion (siehe unter 3.8.1.) wurde ein Volumen abgenommen, das einer Polypeptid-Menge von ca. 10 nmol entsprach. Der Reaktionsansatz für den enzymatischem Abbau der C-terminalen Aminosäuren eines Polypeptids enthielt 200 µl der dialysierten Protein-Lösung (10 nmol) und 5 µl einer Carboxypeptidase P-Lösung (1 µg/µl, gelöst in der unter 3.8.1. beschriebenen H_2O/Essigäure-Lösung) und wurde bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden 20 µl Aliquots entnommen und zur Inhibition der Carboxypeptidase P mit 20 µl einer 1%igen (w/v, gelöst in H_2O) Jod-Essigsäure-Lösung vermischt. Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge wurde der Rückstand in 60 µl Citrat-Puffer gelöst. Von der Lösung, in der sich die durch

die Carboxypeptidase P freigewordenen Aminosäuren befanden, wurden 20 µl einer automatisierten Aminosäureanalyse unterzogen, wobei die freien Aminosäuren durch eine Reaktion mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptoethanol zunächst derivatisiert wurden. Erst nach dieser Vorsäulen-Derivatisierung wurden die Aminosäurederivate durch eine Umkehrphasen-HPLC-Säule (250 x 4.6 mm; selbstgestopft mit Hypersil C18 5µ von Shandon) getrennt und mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spektrometers registriert. Sekundäre Amine wie das Prolin und das Hydroxylprolin konnten aufgrund des Fehlens einer freien Aminogruppe nicht OPA-derivatisiert und damit nicht registriert werden. Weitere Angaben über die automatisierte Aminosäureanalyse können bei Ashman und Bosserhoff nachgelesen werden (63).

3.8.3. Bestimmung der Aminosäurekomposition der Rep-Proteine

Für die Totalhydrolyse wurden 2 nmol Protein-Trockensubstanz mit 100 µl HCl-Lösung (5.7 N HCl, 0.02% (v/v) Mercaptoethanol) versetzt und in einem zugeschmolzenen Röhrchen in Vakuum (nach Spülen mit Stickstoff) für 24 Stunden auf 110°C erhitzt. Nach dem Öffnen des Röhrchens wurden die freigewordenen Aminosäuren in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und der Rückstand in 100 µl Citrat-Puffer gelöst. Davon wurden 30 µl einer automatisierten Aminosäureanalyse in einem Durrum Amino Acid Analyzer, Model D-500, unterzogen (64). In diesem Gerät wurden die freigewordenen Aminosäuren durch Ionenaustausch-Flüssigkeitschromatographie getrennt, danach einer Ninhydrin-Reaktion ausgesetzt und zuletzt bei den Wellenlängen 440 und 570 nm identifiziert. Aus der quantitativen Auswertung des Chromatogramms ergab sich die Aminosäurezusammensetzung des Polypeptids. Bei der sauren Hydrolyse von Polypeptiden ist zu beachten, daß Asparagin und Glutamin zu Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure desamidiert werden. Tryptophan wird bei der Behandlung zerstört, und Cystein bzw. Cystin wird partiell zersetzt.

3.8.4. Auswertung von Aminosäuresequenzen mit Hilfe von EDV-Programmen

Mit Hilfe der Computer-Programme RELATE (65)und ALIGN (66) wurde versucht, statistisch signifikante Homologien in der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen Proteinen zu finden. Ein Maß für die Stärke der Homologie zwischen zwei Sequenzen stellte die Standardabweichungs-Einheit (SD) in beiden Programmen dar. Werte von 10 oder mehr SD-Einheiten deuteten auf eine starke Homologie hin, während Werte von 3 bis 10 SD-Einheiten eine geringere aber dennoch signifikante Homologie (67) bedeuteten. Die Richtlinien dieser Bewertung konnten aus den beiden Programm-Paketen entnommen werden. Die Computer-Analyse mit den Programmen RELATE und ALIGN liefen auf einem VAX/VMS-System.

Computer-Programme für die Ermittlung und das Plotten von Sekundärstruktur- und Hydrophobizitäts-Kurven von Proteinen standen als FORTRAN-Programme auf einem DEC-10 System zur Verfügung. Das Programm zur Ermittlung der Hydrophobizitäts-Kurve war geschrieben nach dem Algorithmus von Doolittle (68).

Die Programme zur Voraussage von Sekundärstrukturen richteten sich nach den Algorithmen von Chou und Fasman, Burgess et al., Nagano und Robson und Suzuki (69).

3.9. Das in vitro-Replikationssystem von RSF1010

3.9.1. Herstellung von E.coli-C600-Zellextrakten

Eine 30 ml-Übernachtkultur wurde in 1.8 l Ty-Medium (mit dem Zusatz von 0.2% (w/v) Glucose und 0.04 M MOPS) verdünnt und in einem 5 l-Schüttelkolben bis zu einer $O.D._{600}$ von 1.0 bei 37°C wachsen gelassen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 0 bis 4°C ausgeführt (10,70). Durch Zugabe von 600 g Eiswürfel wurde die Kultur schnell abgekühlt, in GS-3-Becher überführt und für 5 Minuten bei 7000 U/Min. zentrifugiert. Die Zellen wurden in 60 ml eiskaltem Zellextrakt-Puffer A resuspendiert, in zwei vorher ausgewogene SS34-Becher überführt und erneut für 5 Minuten bei 10.000 U/Min. zentrifu-

giert. Nach Resuspension (1 ml Zellextrakt-Puffer B pro g Zellpaste) wurden gleiche Hälften auf zwei 50Ti-Zentrifugenröhrchen mit Verschlußkappen verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen (10 bis 20 Minuten in einem 10°C-Wasserbad) wurden 0.01 Volumen 100 mM Na_2-EDTA und 0.01 Volumen Lysozym-Lösung (30 mg/ml in einer 20 mM Na-Azetat-Lösung, pH 4.6) hinzugegeben, die Suspension 30 bis 45 Minuten in einem Eisbad inkubiert, einmal in flüssigem Stickstoff eingefroren, und erneut bei 10°C aufgetaut. Bei unvollständiger Zellyse wurde dieser Schritt wiederholt. Nach Zentrifugation des Zellysats bei 35.000 U/Min. für 15 Minuten in einem 50Ti-Rotor (Beckman) wurde der klare Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen, in 2 ml-Portionen auf Corex 15-Gläser verteilt, gut gemischt und bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren (Fraktion I). Zu 2 ml Fraktion I in einem Corex 15-Glas wurden 0.2 ml einer frisch angesetzten 30%igen (w/v) Streptomycinsulfat-Lösung in Zellextraktpuffer A (10,71) portionsweise und unter Rühren in 30 Minuten zugegeben. Danach wurde das Präzipitat in einem SS34-Rotor mit Adaptern für 10 Minuten bei 15.000 U/Min. abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Corex 15-Glas übertragen, auf eine 73%-Sättigung mit Ammoniumsulfat (0.47 g/ml) gebracht, 30 Minuten gerührt und wie vorher zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 2 ml einer Ammoniumsulfat-Lösung (1 g + 2 ml Zellextrakt-Puffer A) gewaschen, 10 Minuten zentrifugiert, das Proteinpellet in 400 µl Zellextrakt-Puffer A gelöst und 3.5 Stunden gegen 100 ml Zellextrakt-Puffer C (mit einmaligem Pufferwechsel) dialysiert. Das dialysierte Material wurde portionsweise bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren (Fraktion 0-73 bzw. Fraktion II).

3.9.2. Test auf DNA-Synthese

Der Standard-Reaktionsansatz (25 µl) enthielt (10)Hepes·KOH (pH 8.0), 40 mM; $Mg(OAc)_2$, 10 mM; KCl, 100 mM; Dithiothreitol, 800 µM; ATP, 2 mM; GTP, CTP, UTP, je 500 µM; dATP, dGTP, dCTP und [Methyl-^{3}H]dTTP (180 cpm/pmol), je 50 µM;

NAD, 50 µM; cAMP, 50 µM; Creatinphosphat, 15 mM; Creatin-Kinase, 100 µg/ml; Polyethylenglycol 6000, 2.5% (w/v); Rifampicin, 20 µg/ml; Template-DNA, 15 µg/ml; RepA-Protein, 3 µg/ml; RepB-Protein, 1 µg/ml; RepC-Protein, 6 µg/ml; und E.coli C600-Enzym-Fraktion II, 7-10 mg/ml.

Nach dem Zusammenmischen der Komponenten auf Eis wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 30°C gestartet.Nach 60 Minuten wurde die DNA-Synthese durch die Zugabe von 200 µl einer Stop-Lösung II und anschließendem Erhitzen der Proben in einem 90°C-Wasserbad für10 Minuten beendet. Dann wurden die Proben auf 0 bis 4°C abgekühlt, mit 500 µl einer eiskalten 2 M Trichloressigsäure-Lösung versetzt, für 5 bis 10 Minuten auf Eis stehengelassen und über Nitrozellulosefilter (Porengröße 0.45 µ) filtriert (72). Die Filter wurden mit 5%iger (w/v) Trichloressigsäure in 0.05 M Na_2-Pyrophosphat und 2%iger (v/v) Essigsäure gewaschen und unter einer Rotlichtlampe getrocknet. Die Radioaktivität wurde in einer auf Toluen-basierenden Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

3.9.3. Quantitative spektrometrische Proteinbestimmung nach der Coomassie-Blue-Methode

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Spector (73). Die Farbreagenslösung bestand aus 0.01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G (Sigma), 5% (v/v) Ethanol und 8.5% (v/v) H_3PO_4. Für die Ermittlung der Eichkurve wurden Rinderserumalbumin-Lösungen (BSA) bekannter Konzentration mit der Farbreagenslösung 1:20 verdünnt. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die lineare Abhängigkeit der Absorptionswerte von den jeweiligen Konzentrationswerten an BSA wurde graphisch aufgetragen, so daß aus dem Kurvenverlauf die unbekannte Konzentration von Proteinlösungen bestimmt werden konnte.

4. ERGEBNISSE

4.1. Klonierung und Sequenzierung der Replikationsgene repA, B und C

Aus vorherigen Arbeiten (6,10,11) war bekannt, daß sich auf dem 4207 bp-großen AccI/AccI/PstI-Fragment [3.6-7.8] (siehe Abb.1) die Replikationsgene repA, B und C befinden. Deshalb wurde für die Nukleotid-Bestimmung der Replikationsgene einmal das 1905 bp-große AccI-Fragment [3.6-5.5] und zum anderen das 2301 pb-große AccI/PstI-Fragment [5.5-7.8] benutzt. Hergestellt wurden die beiden Fragmente durch Spaltung der RSF1010-DNA mit AccI, Auffüllen der überstehenden DNA-Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments, erneute Verdauung mit PstI und die darauffolgende präparative Isolierung beider DNA-Fragmente. Das AccI-Fragment wurde mit glatten Enden (blunt end) in die HincII-Klonierungsstelle des Phagen M13mp9 insertiert, wobei jedoch nur eine Orientierung erhalten wurde (M13repB9, siehe Abb.7). Dies läßt auf eine für den Phagen letale, nur in einer Orientierung wirkende Sekundärstruktur (Transkriptions- oder Replikations-Terminator), oder auf ein für den Phagen letales nur in einer Orientierung kodiertes Produkt schließen. Das gleiche galt auch für die Klonierung des AccI-Fragments in den Phagen M13mp8. Das AccI/PstI-Fragment hingegen wurde gerichtet und in beiden Orientierungen in die Phagen M13mp8 und M13mp9 eingesetzt, die mit HincII und PstI behandelt waren. Daraus entstanden die rekombinanten Phagen M13repAC8 und M13repAC9.

Die drei chimären Phagen M13repB9, M13repAC8 und M13repAC9 wurden nun einer Exonuklease-Verdauung unterzogen. Dazu wurde zunächst M13repB9 und M13repAC9 mit BamHI und M13repAC8 mit PstI geschnitten. Dann wurden die linearisierten DNA-Moleküle mit Bal31 verdaut, nach verschiedehen Verdauungszeiten gestoppt, fraktioniert, und mit einer zweiten Restriktionsendonuklease so geschnitten, daß eine Population an Vektor-Fragmenten und eine zweite Population an Insert-Fragmenten entstand (siehe Abb.5). Die Population von DNA-Fragmenten von M13repB9 und M13repAC9 wurden mit PstI, die von

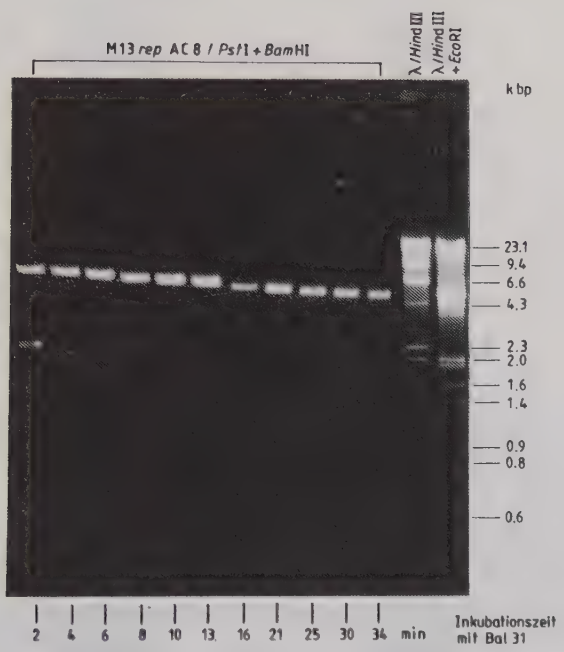


Abb. 5

Bal31-Verdauung von linearer M13-RSF1010 Hybrid-DNA. Die doppelsträngige RF-DNA des Phagen M13repAC8 wurde an der PstI-Stelle geschnitten und anschließend mit der Nuklease Bal31 verdaut. Aliquots wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen, mit der Restriktionsendonuklease BamHI versetzt und einer Elektrophorese in einem 1%igen (wv) TB-Agarosegel unterzogen. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, wurden dabei die mit Deletionen versehenen Insert-Fragmente von den größeren durch Deletionen geschädigten Vektor-Fragmenten abgetrennt. Die Insert-Fragmente wurden anschließend präparativ isoliert und für weitere Subklonierungen in den M13-Vektoren mp8 und mp9 verwendet (siehe Text). Für die Größenmarkierung der DNA-Fragmente dienten λ-Standards.

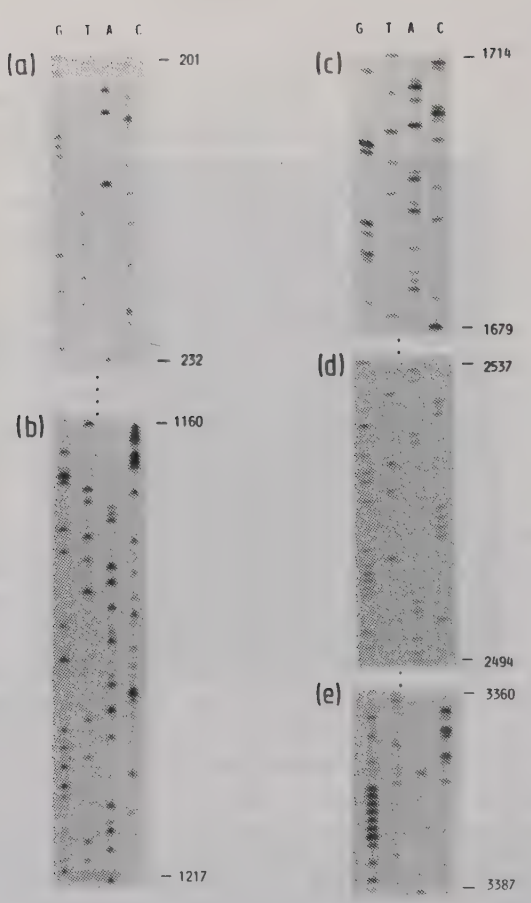


Abb. 6

Ausgewählte Sequenz-Autoradiogramme von der rep-Gen-Region. Die markierten Oligonukleotide wurden nach der Dideoxy-Methode erzeugt und in einem 0.2 mm-dicken 6%igen Acrylamidgel bei 25W (2000 V) für 90 Minuten elektrophoresiert. Danach wurde das Gel fixiert, getrocknet (1.5 h bei 60 °C) und für 24 h autoradiographiert. Als Template für die DNA-Synthesereaktion dienten die einzelsträngigen DNAs der Phagen M13repB9Δ29 (a), M13repB9Δ1 (b), M13repAC9Δ13 (c), M13repAC9Δ18 (d) und M13repAC8Δ30 (e). Die Zahlen geben Nukleotid-Positionen an und beziehen sich auf die in Abb.8 gezeigte DNA-Sequenz. (a) Anfang des repB-Gens; (b) Ende des repB-Gens; (c) Anfang des repA-Gens; (d) Ende des repA-Gens und Anfang des repC-Gens; (e) das Ende des repC-Gens.

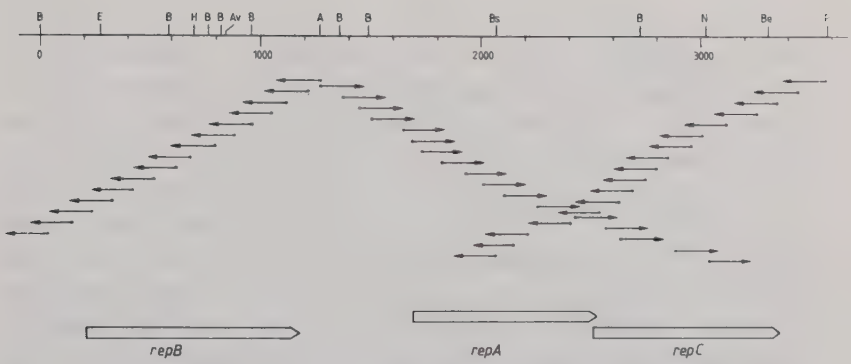


Abb. 7

Die für die RSF1010 rep-Region benutzte Sequenzierungsstrategie. Die Pfeile geben das Ausmaß und die Richtung der Sequenzen an, die in getrennten Experimenten nach der Sanger'schen Dideoxy-Methode erhalten wurden. Die offenen Balken mit den spitz zulaufenden Enden geben das genaue Ausmaß und die Transkriptionsrichtung der sequenzierten Replikationsgene an. Zur Orientierung sind in der Restriktionskarte Endonuklease-Erkennungsstellen angegeben: A, AccI; Av, AvaI; B, BalI; Be, BstEII; Bs, BssHII; E, EcoRV; H, HinfI; N, NarI; P, PstI. Die Zahlen unter der Restriktionskarte geben Nukleotidpaare an.

M13repAC8 mit BamHI geschnitten. Sie wurden präparativ isoliert und bestanden von dem intakten Insert ausgehend aus immer kleiner werdenden Fragmenten: Auf der der einen Seite hatten sie glatte Enden (blunt end) aufgrund der Bal31-Verdauung und auf der anderen Seite überstehende Enden infolge des entsprechenden Nachschneidens mit der Endonuklease. Dementsprechend wurde das vom M13repB9 und M13repAC9 kommende Spektrum an kleiner werdenden DNA-Inserts in den Phagen M13mp9 insertiert, der mit HincII und PstI geschnitten war. Die Größen-Fraktionen an DNA-Fragmenten, die aus M13repAC8 stammten, wurden zwischen den HincII- und BamHI-Enden des Phagen M13mp8 eingesetzt.

Man erhielt rekombinante Phagen, aus denen zunächst RF-DNA hergestellt wurde. Die RF-DNA wurde auf variierende Insert-Größe untersucht. Nur von den rekombinanten Phagen wurden Einzelstränge hergestellt, deren Inserts eine gerichtete von einem Ende ausgehende Größenabnahme von 100 bis 200 bp aufwiesen. Die Sequenzierung wurde ausgeführt mit diesen Einzelsträngen nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode (siehe dazu Abb.6). Die Sequenzierungsstrategie ist in Abb.7 gezeigt. In der Abb. 8 ist die dazugehörige Sequenz des 3580 bp-großen Fragments wiedergegeben, auf dem sich die Replikationsgene repA, B und C befinden. Die sich aus der DNA-Sequenz ergebenden Aminosäuren der drei Replikationsgene sind ebenfalls gezeigt.

4.2. Amino- und Carboxy -terminale Analyse der Replikationsproteine A, B und C von RSF1010

Die drei hochgereinigten Replikationsproteine A, B und C (siehe Abb.9) wurden einem automatisierten Edman-Abbau in einem Flüssigkeits-Phasen-Sequenzer unterzogen (siehe unter Methodik 3.8.1.). Vom N-Terminus konnten beim RepA-Protein 53, beim RepB-Protein 45 und beim RepC-Protein 28 Aminosäuren bestimmt werden (siehe Abb.8 und 10). Für die Bestimmung der Aminosäuren am Carboxy -Ende der drei Replikationsproteine fand eine Verdauung mit der Carboxypeptidase P statt. Die nach verschiedenen Zeitintervallen freigewordenen Aminosäuren wurden zunächst derivatisiert, dann durch eine Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie getrennt und zum Schluß fluorospektrometrisch detektiert(siehe unter Methodik 3.8.2.). Bei dem RepA-Protein waren nach dem ersten Zeitintervall einer Carboxypeptidase P-Verdauung die Elutionspeaks der freigewordenen Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin und nach dem zweiten Zeitintervall zusätzlich die freigewordenen Aminosäuren Glycin und Arginin zu erkennen (siehe Abb.11). Damit war das C-terminale Ende von RepA eindeutig festgelegt, da die Aminosäuren genau den Aminosäuren entsprachen, die sich aus der DNA-Sequenz ergaben (siehe Abb.8).

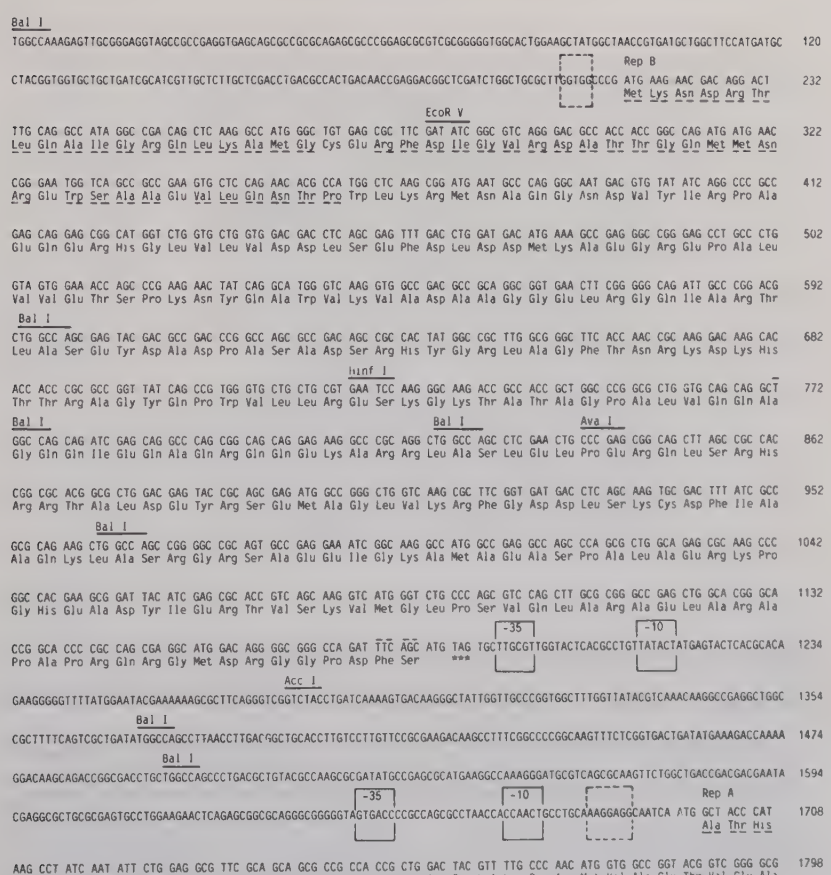
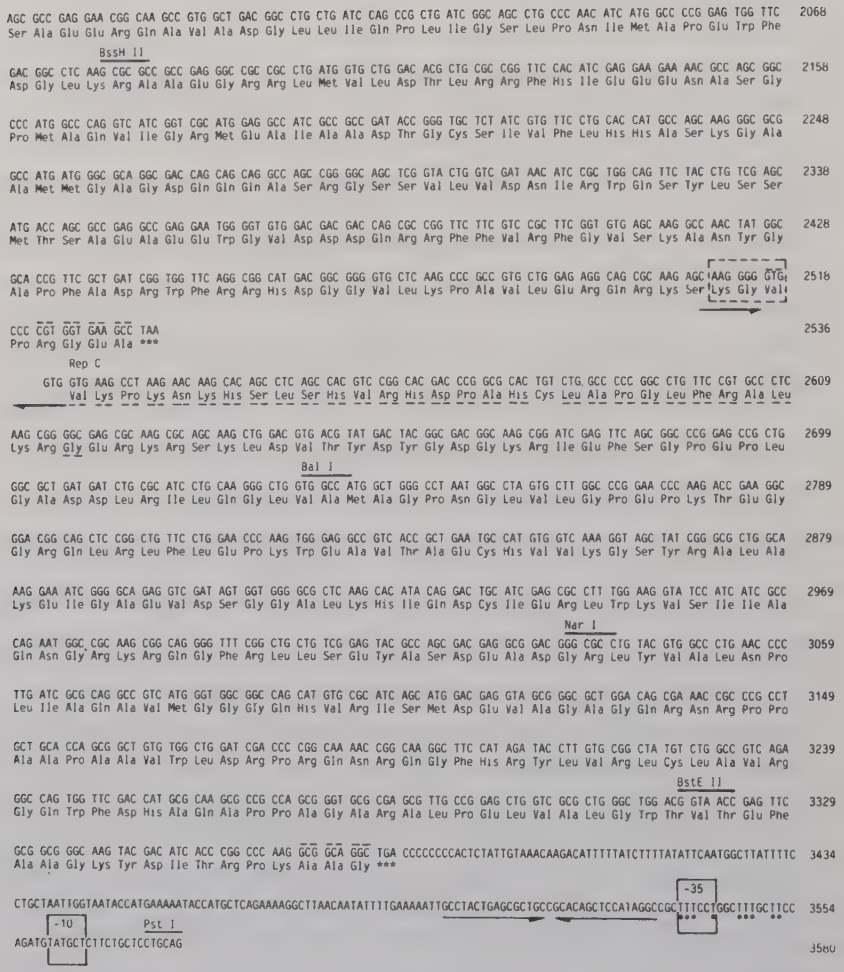


Abb. 8

Nukleotidsequenz der rep-Region von RSF1010. Die sequenzierte Region (3580 bp) befindet sich zwischen den RSF1010-Koordinaten 4.2 und 7.8 (siehe Abb.1). Die Sequenz des nicht-kodierenden DNA-Stranges und die vorausgesagte Aminosäuresequenz der repA, B und C -Genprodukte sind gezeigt. Potentielle ribosomale Bindungsstellen sind mit gestrichelten Linien eingerahmt. DNA-Sequenzen, die Homologien zu den -35- und -10-Regionen von bekannten E.coli-Promotoren aufweisen, sind mit einer festen Linie eingefenstert. Die Lage dieser durch Computersuche ermittelten Promotoren ist in guter Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopisch kartierten



RNA-Polymerase-Bindungsstellen (siehe Abb.1). Die mit gestrichelten Linien markierten Aminosäuren konnten durch eine NH_2 - und COOH-terminale Aminosäureanalyse der gereinigten Replikationsproteine identifiziert werden. Pfeile, die entgegengesetzt gerichtet sind, geben Palindrom-artige Regionen wieder. Dem Palindrom, das sich von der Position 3501 bis 3533 erstreckt, schließt sich eine T-reiche Strecke an (durch Punkte markiert), wodurch die für einen Transkriptionsterminator charakteristischen Strukturmerkmale erfüllt sind. Zur Übersicht sind einige Restriktionsstellen sowie nach jeder Zeile die Nukleotidlängen angegeben.

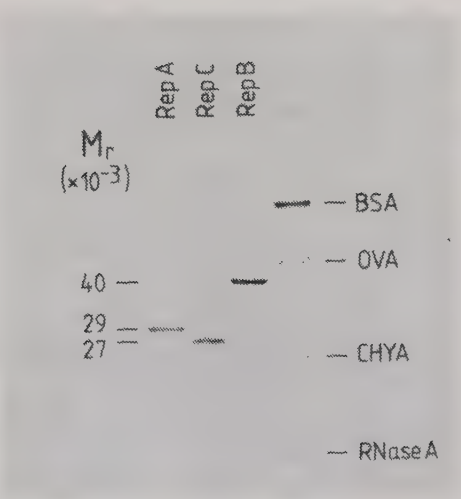


Abb. 9

Polyacrylamidgel-Elektrophorese der gereinigten RepA, B und C Proteine. Jedes der drei Replikationsproteine wurde mit Hilfe von Expressionsvektoren, in denen geeignete DNA-Fragmente aus der RSF1010-Region insertiert waren, in Zellen von E.coli HB101 zur Überproduktion gebracht und durch verschiedene säulenchromatographische Verfahren gereinigt. Je 2 µg der denaturierten und reduzierten Proteine wurden elektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Ihre Molekularmassen wurden anhand der zurückgelegten Laufstrecken von Rinderserumalbumin (BSA, 68000), Ovalbumin (OVA, 43000), Chymotrypsinogen (CHYA, 25700) und RNase A (13600) ermittelt und sind angezeigt.

Nach dem ersten Zeitintervall der Verdauung konnte bei dem RepB-Protein die freigewordene Aminosäure Serin und nach dem zweiten Zeitintervall Phenylalanin identifiziert werden. Längere Verdauungszeiten ergaben keine zusätzlichen Elutionspeaks, was wahrscheinlich auf eine schlechte oder keine Abspaltung von Aminosäuren in der Nähe von Serin oder Glycin am Carboxy -Terminus durch die Carboxypeptidase P zurückzuführen ist (74,75). Ein Vergleich dieser Daten mit den Aminosäuren, die sich aus der DNA-Sequenz ableiten, zeigt, daß

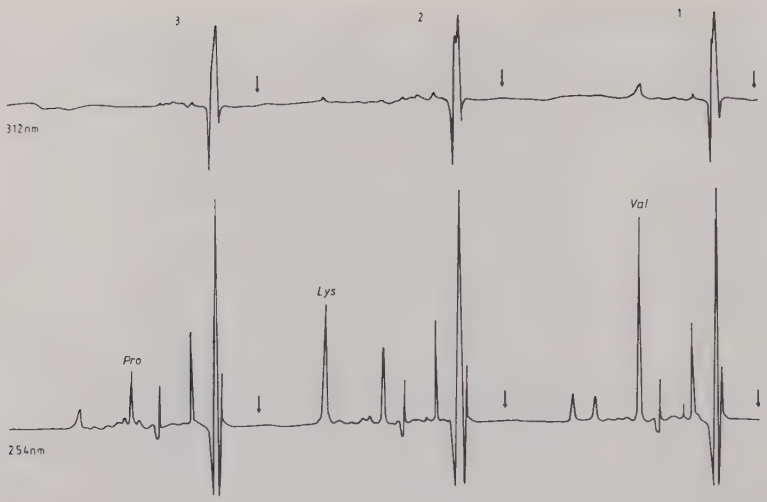


Abb. 10

Sequenzierlauf zur Bestimmung der NH_2-terminalen Aminosäuren des RepC Proteins. Diese konnten durch eine automatisierte Flüssigkeitsphasen-Sequenzierung bis zur 31. Position bestimmt werden (siehe Text). In der Abbildung sind die freigewordenen derivatisierten Aminosäuren der ersten drei Abbauzyklen gezeigt, aus denen sich die Sequenz NH_2-Val-Lys-Pro- ergibt. Die Pfeile geben den Injektions-Zeitpunkt der freigewordenen derivatisierten Aminosäuren in die Umkehrphasen-HPLC-Säule an. Nach dem Säulenlauf wurden die derivatisierten Aminosäuren bei den Wellenlängen 254 und 312 nm detektiert und anhand ihrer Retentionszeit identifiziert.

nach der DNA-Sequenzanalyse das Ende HOOC-Met-Ser-Phe- und nach der Aminosäuresequenzanalyse das Ende HOOC-Ser-Phe- lautet. Das heißt, Methionin wird entweder in das RepB-Protein nicht eingebaut oder durch eine Carboxypeptidase nach dem Einbau spezifisch abgespalten.

Nach der DNA-Sequenz (Abb.8) endet das repB-Gen mit dem Amber-Stop-Codon UAG. Isoliert wurde das RepB-Protein aus einem Amber-Suppressor-Stamm (E.coli HB101), in dem das Amber-Stop-Codon supprimiert werden kann (119). Um die Frage zu beantworten, ob das gereinigte RepB-Protein aufgrund

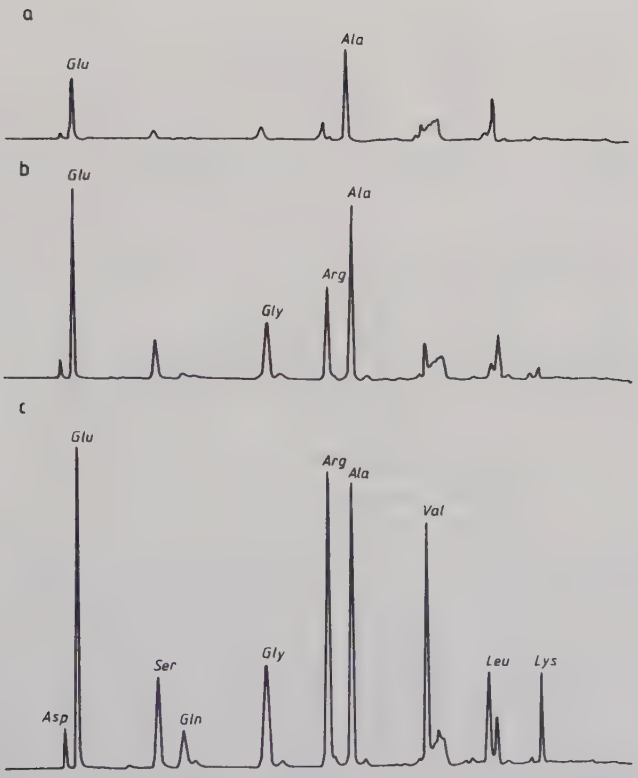


Abb. 11

Analyse der C-terminalen Aminosäuresequenz des RepA-Proteins. Das gereinigte RepA-Protein wurde für 2 (a), 5 (b) und 10 Minuten (c) einer Carboxypeptidase P-Verdauung ausgesetzt. Die freigewordenen Aminosäuren wurden zuerst OPA (ortho-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol)-derivatisiert, dann in eine Umkehrphasen-HPLC-Säule injiziert und nach erfolgtem Säulenlauf fluorospektrometrisch detektiert und nach ihrer Retentionszeit identifiziert (siehe Text). Sekundäre Aminosäuren wie das Prolin werden nicht OPA-derivatisiert und entziehen sich somit einem fluorospektrometrischen Nachweis. Nach der Abfolge der neu auftretenden derivatisierten Aminosäuren mit zunehmenden Verdauungszeiten unter Mit-Berücksichtigung der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten C-terminalen Aminosäuren (siehe Abb.8) lautet die Reihenfolge COOH-Ala-Glu-Gly-Arg-Pro-Val-.

einer Suppression des Unsinn-Codons UAG als verlängertes Protein vorliegt, wurde die Aminosäurekomposition des Proteins nach einer sauren Totalhydrolyse bestimmt. Die Daten in der Tabelle 6 zeigen, daß die Aminosäurekomposition des RepB-Proteins in Einklang steht mit der abgeleiteten Aminosäurekomposition aus der DNA-Sequenz, die damit bestätigt wird. Die Gesamtzahl der Aminosäuren des RepB-Proteins, die nach der Totalhydrolyse ermittelt wurde, betrug 316 ohne die unter diesen Bedingungen zerstörten Aminosäuren Tryptophan und Cystein. Dieser Wert stimmt überein mit der Gesamtzahl der Aminosäuren, die sich aus der DNA-Sequenz bei Nicht-Berücksichtigung von Tryptophan und Cystein ergibt (siehe Tabellen 5 und 7). Daraus folgt, daß das RepB-Protein aus 322 Aminosäuren besteht, mit der Sequenz HOOC-Ser-Phe- endet und somit nicht als verlängertes Protein vorliegt.

Die Aminosäuresequenzanalyse der ersten zeitlich limitierten Verdauung des RepC-Proteins mit der Carboxypeptidase P ergab Elutionspeaks in der Glycin- und Alanin-Position. Das quantitative Verhältnis beider Peaks war 1:1. Nach dem zweiten Zeitintervall der Verdauung konnten wie vorher wieder Glycin und Alanin detektiert werden, allerdings diesmal im Verhältnis 1:2. Die Reihenfolge der Aminosäuren sowie das quantitative Verhältnis beider Aminosäuren zueinander am Carboxy-Terminus des RepC-Proteins passen zu der Aminosäuresequenz, die sich aus der DNA-Sequenz ergibt (siehe Abb. 8).

4.3. Analyse von offenen Leserahmen und Signalstrukturen in der Nukleotidsequenz

In der Abb.12 ist eine Sequenzanalyse hinsichtlich potentieller Initiations- und Terminations-Codons in allen 3 Leserahmen für beide komplementären DNA-Stränge gezeigt. Die offenen Leserahmen der Replikationsgene repA, B und C sind festgelegt durch die Bestimmung der NH_2- und COOH-terminalen Aminosäuren der drei Replikationsproteine. Weitere offene Leserahmen, die die Informationen für hypothetische Proteine mit einer Molekularmasse gleich und größer als 15.000 Kilodaltons (kDa) tragen, sind eingezeichnet. Für die Existenz

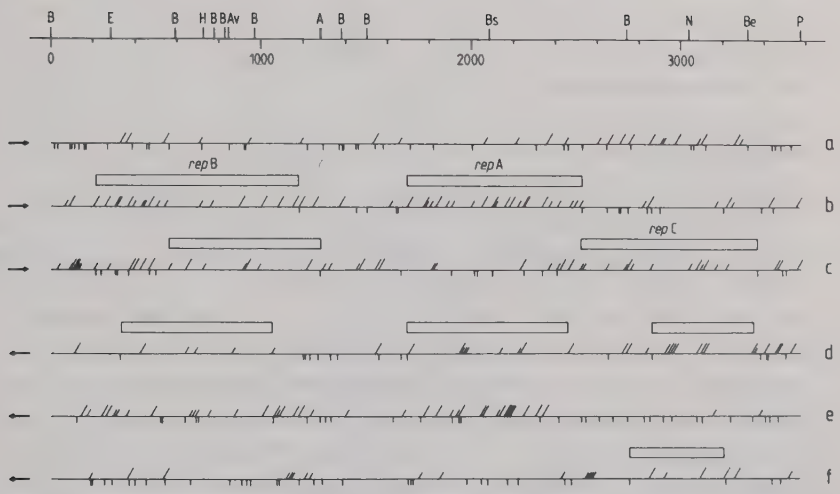


Abb. 12

Analyse der offenen Leserahmen. Die Karte gibt die möglichen Initiations- und Terminations-Codons an, die innerhalb der sequenzierten Region in den 6 möglichen offenen Leserahmen beider DNA-Stränge gefunden wurden. Die langen und kurzen schrägen Linien stellen die ATG bzw. die GTG Start-Codons dar. Die vertikalen Linien zeigen die TGA, TAA oder TAG Terminations-Codons an. Die Richtung der Transkription wird durch die Pfeile wiedergegeben. Die offenen Balken stehen für hypothetische offene Leserahmen mit einer Kodierungskapazität von größer als 15 kDa. Die offenen Leserahmen der rep-Gene sind bezeichnet. Erläuterungen zu der Lage der sequenzierten Region und zu den angegebenen Restriktionsstellen sind in den Abb. 7 und 8 zu finden.

dieser hypothetischen Proteine gibt es jedoch keinen Beweis.

Das Replikationsgen repB besitzt eine Länge von 972 Basen (Nukleotide 215 bis 1186), startet mit ATG und endet mit TAG. Dem Initiations-Codon ist eine Ribosomen-Bindungsstelle vorgelagert, in der 4 Basen komplementär sind zum 3'-Ende der 16S-ribosomalen RNA von E.coli. Das Replikationsgen repA besteht aus 280 Codons (Nukleotide 1697 bis 2536), beginnt mit dem Initiations-Codon ATG und endet mit dem Terminations-Codon TAA. 5'-Aufwärts vom ATG-Codon befindet sich eine Sequenz (Nukleotide 1684 bis 1690), die starke Homologie zu einer ribosomalen Bindungsstelle aufweist. Die kodierende Sequenz für das repC-Gen startet mit einem GTG-Codon bei der Position 2523 und terminiert mit einem TGA Ochre-Codon bei der Position 3374. Dem 852 Basen umfassenden repC-Gen geht eine mögliche ribosomale Bindungsstelle zwischen den Koordinaten 2510 und 2518 voraus. Obwohl allen drei Replikationsgenen eine gute Shine-Dalgarno-Sequenz vorgelagert ist, bestehen Unterschiede in der Länge der Sequenz, die sich zwischen dem Initiations-Codon und der möglichen ribosomalen Bindungsstelle befindet. Bei dem repA-Gen besteht die vorgelagerte Zwischensequenz aus 6 Nukleotiden (5' CAAUCA 3'), bei dem repB-Gen aus 4 Nukleotiden (5' CCCG 3') und bei dem repC-Gen ebenfalls aus 4 Nukleotiden (5' CCCC 3'). Sowohl die Länge dieser Zwischensequenz (normaler Bereich zwischen 5 und 9 Basen) wie auch ihre Basenkomposition (A und U bevorzugt, G benachteiligt) sind wichtig für die Effektivität einer Initiationsregion (76). Deshalb ist es möglich, daß die in Abb.15 (Spur 5) erkennbare Mehrproduktion an RepA- gegenüber RepC-Protein auf einer unterschiedlichen Effektivität der Initiationsregion während des Translationsvorgangs beruht. Das gleiche gilt für das in Prokaryonten weniger häufig benutzte Initiations-Codon GUG (zu finden bei dem repC-Gen), wo vermutet wird, daß dieses alternative Start-Codon weniger effizient als das AUG-Codon im Initiationsprozeß funktioniert (76).

Das 3'-Ende des repA-Gens und der 5'-Start des repC-Gens

überlappen sich in 14 Nukleotiden. Interessanterweise befindet sich das Initiations-Codon von repC sowie die dazugehörige potentielle Shine/Dalgarno-Sequenz in einer auf mRNA-Ebene thermodynamisch stabilen Sekundärstruktur, wodurch beide Erkennungssignale für den Initiationsapparat der Translation schwerer zugänglich sind (Abb.13). Dies deutet auf eine Kopplung auf Translationsebene hin, wobei eine effektive Translation des zweiten Gens von der effektiven Translation des ersten Gens abhängt (77,78,79). Diese Annahme konnte durch experimentelle Ergebnisse bestätigt werden (siehe Abb. 14 und 15). Wurde nämlich das BssHII/PstI-Fragment (Nukleotide 2081 bis 3576) in einen Expressionsvektor

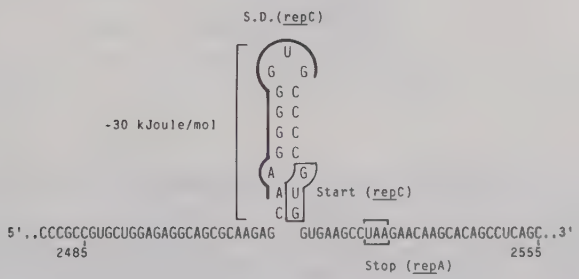


Abb. 13

Die Überlappungsregion der repA- und repC-Gene. Gezeigt ist ein Ausschnitt der mRNA, auf dem sich der Anfang des repC-Gens und das Ende des repA-Gens befinden. Dabei überlappen die Enden beider Gene in einem Bereich von 14 Nukleotiden. Die mutmaßliche ribosomale Bindungsstelle (S.D.) und das Initiations-Codon des repC-Gens (GUG) liegen in einer thermodynamisch stabilen Sekundärstruktur und scheinen dadurch maskiert zu sein. Die Berechnung der Energie, die bei der Bildung dieser Sekundärstruktur freigesetzt wurde, erfolgte nach der Methode von Tinoco et al. (87) unter Verwendung der verbesserten Parameter von Borer et al. (88). Die Zahlen unterhalb der Sequenz beziehen sich auf die Nukleotid-Positionen in Abb.8.

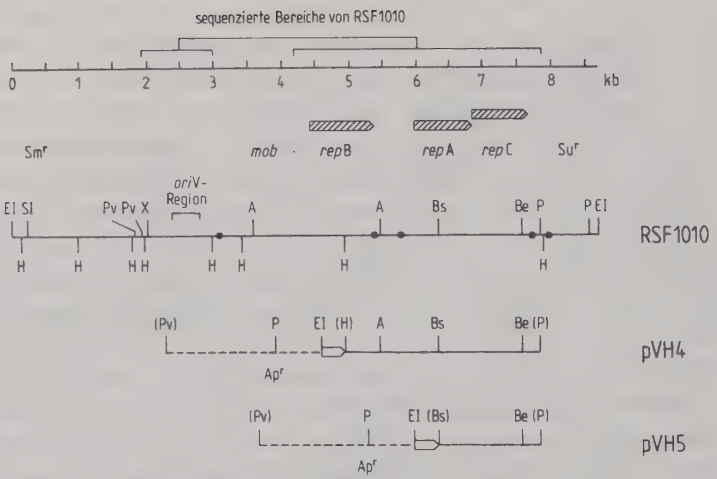


Abb. 14

Oberer Teil: Physikalische und genetische Karte von RSF1010. Erläuterungen dazu sind in Abb.1 zu finden.
Unterer Teil: Strukturen der Expressionsplasmide pVH4 und pVH5. Die RSF1010-Sequenzen sind als durchgezogene Linien dargestellt. Die Restriktionsfragmente von RSF1010, die aufgrund einer vorausgegangenen T4 DNA-Polymerase-Behandlung glatte Enden hatten, wurden jeweils in die PvuII-Schnittstelle des Expressionsvektors (ptac12) insertiert. Die gebrochenen Linien stehen für Vektor-Sequenzen. Die Restriktionsschnittstellen, die bei den Konstruktionen verloren gingen, sind in Klammern angegeben. Die offenen Boxen mit den spitz zulaufenden Enden symbolisieren den tac-Promotor mit der dazugehörigen Transkriptionsrichtung.

(das Plasmid ptac12) jeweils in beiden Orientierungen insertiert, so fand in keinem der beiden Fälle eine nachweisbare Produktion des RepC-Proteins unter der Kontrolle des regulierbaren tac Promotors im induzierten Zustand statt (Abb.15, Spur 2 und 3). Auf diesem insertierten RSF1010-Fragment befand sich das intakte repC-Gen, jedoch war das repA-Gen zerstört. Dagegen erfolgte eine nachweisbare Translation des repC-Gens, wenn vorher das repA-Gen translatiert werden konnte. Voraussetzung dafür war eine

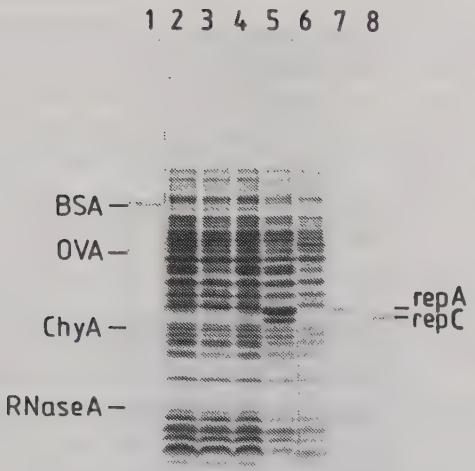


Abb. 15

Expression der repA- und repC-Gene unter Kontrolle des tac-Promoters. Exponentiell wachsende Zellen von E.coli HB101, die neben dem Plasmid pVH1 [liefert den für die Blockierung des tac-Promotors notwendigen lac-Repressor (11)] ein rep-Expressionsplasmid enthielten, wurden mit IPTG [inaktiviert den lac-Repressor und ermöglicht dadurch den Transkriptionsstart am tac-Promotor (11)] versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die induzierten Zellen wurden geerntet, lysiert und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese hinsichtlich ihres Proteingehaltes analysiert (siehe Methodik, Abschnitt 3.7.). Spuren: 1, Eichproteine; 2, HB101[pVH5',pVH1]-Lysat; 3, HB101[pVH5,pVH1]-Lysat; 4, HB101[pVH4',pVH1]-Lysat; 5, HB101[pVH4,pVH1]-Lysat; 6, HB101[pVH1]-Lysat; 7, gereinigtes RepA-Protein (2 µg); 8, gereinigtes RepC-Protein (2 µg). Die Plasmide pVH4' und pVH5' entsprechen den Plasmiden pVH4 und pVH5 (siehe Abb.14), außer daß die RSF1010-Fragmente in der Gegenorientierung in den Expressionsvektor insertiert wurden.

Klonierung des HinfI/PstI-Fragments (Nukleotide 723 bis 3576) von RSF1010, auf dem sich die intakten Gene repA und C befanden, in den Expressionsvektor ptac12. Im induzierten Zustand produzierte der Stamm die Proteine RepA und C, wenn das insertierte RSF1010-Fragment die richtige Orientierung aufwies (siehe Abb. 14 und 15 (Spur 5)). Dabei trat das RepA- und das RepC-Protein in einem Mengenverhältnis von ungefähr 3:1 auf.

Zwischen dem repB- und dem repA-Gen liegt eine Zwischenregion von 510 Nukleotiden (Nukleotide 1187 bis 1696), in der sich eine ungewöhnlich lange 5'-untranslatierte Region befinden könnte. Eine Analyse dieser Nukleotidsequenz zeigt, daß darin 10 Initiations-Codons (AUG bzw. GUG) mit den dazugehörigen im gleichen Leserahmen befindlichen Terminations-Codons vorkommen (siehe Abb.16). Bei der m-RNA von Eukaryonten konnte gezeigt werden, daß ein Entfernen eines derartigen mRNA-Vorläufers (leader) eine Zunahme der Expression des nachfolgenden Genprodukts verursacht (76,80,81,82). Das heißt durch die 5'-untranslatierte Region eines Transkripts, das AUG-Tripletts vor der eigentlich kodierenden Sequenz (hier das repA- und das repC-Gen) enthält, kann eine Regulation auf Translationsebene ausgeübt werden. Dabei wird angenommen, daß aufwärts gelegene ATG-Tripletts als Barriere agieren, die die Ribosomen von der potentiellen Initiationsstelle, die weiter abwärts liegt, abbringen. Die Möglichkeit, daß bei diesem Vorgang kleinere Translationsprodukte entstehen können, ist nicht auszuschließen.

Ferner wurde die Nukleotid-Sequenz nach Signalstrukturen abgesucht, von denen man weiß, daß sie in der Interaktion mit der RNA-Polymerase beteiligt sind und daß sie konserviert in den Promotoren von E.coli Genen vorkommen(83). Insgesamt konnten 3 mögliche Promotoren mit Hilfe einer Vergleichssequenz (Consensus) für die -35- und -10-Region identifiziert werden (Tabelle 4). Ihre Lokalisierung und Orientierung waren in voller Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopisch kartierten RNA-Polymerase-Bindungsstellen von RSF1010

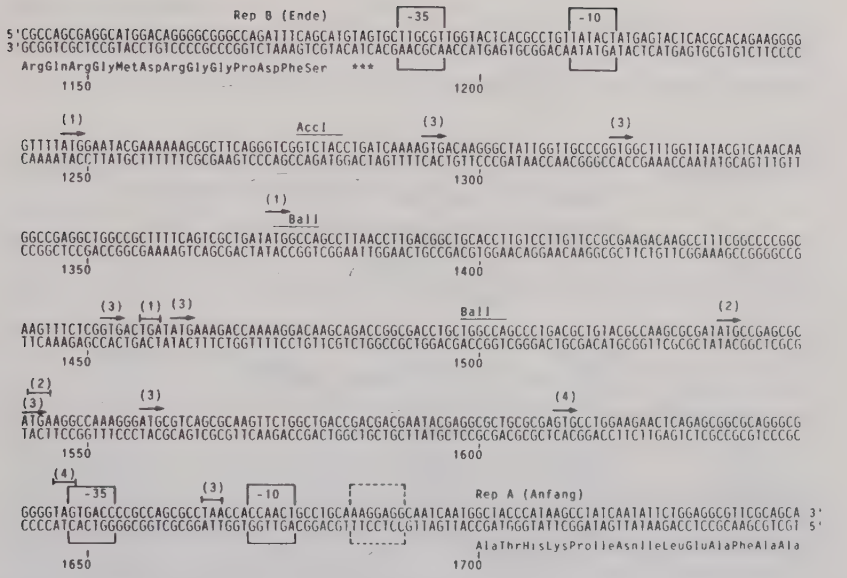


Abb. 16

Strukturelle Merkmale der zwischen den Genen repB und repA gelegenen RSF1010-Region. Die Region zeichnet sich durch mehrfache Initiations-Tripletts (Pfeile) aus, denen im gleichen Leserahmen (eingeklammerte Zahlen) in kurzen Abständen ein Terminations-Triplett (⊢⊣) folgt (siehe Text). Die mit durchgezogenen Linien eingefensterten Sequenzen zeigen eine ausgeprägte Homologie zu der Consensus-Sequenz von bekannten E.coli-Promotoren (83) und stimmen lagemäßig sehr gut mit den beiden vor dem repA-Gen kartierten RNA-Polymerase-Bindungsstellen überein (siehe Abb.1). Die mit einer gestrichelten Linie eingerahmte Sequenz ist vermutlich die zum repA-Gen gehörende Ribosomen-Bindungsstelle (siehe Text). Die unter der Sequenz angegebenen Nukleotidpositionen entsprechen denen in Abb.8.

(7) und den in vivo-Daten (11). In allen Fällen betrug der Trennabstand der -35- und -10 -Region 15 bis 21 Basenpaare, der bei E.coli-Promotoren beobachtet wurde (84).

Tabelle 4: Vergleich der -35/-10-Region von möglichen RSF1010-Promotoren mit der Consensus-Sequenz von E.coli-Promotoren

Promotor	Sequenz		Abstand (bp)
	-35	-10	
RSF-P1	TTGCGT	TATACT (1217)	16
RSF-P2	GTGACC	CCAACT (1676)	17
RSF-P3	TTTCCA	TATGCT (3565)	17
Consensus	TTGACA	TATRAT	17

Die Zahlen in Klammern geben die Position des letzten Nukleotids in der -10-Region an. R steht für Purin.

Die ersten beiden Promotoren RSF-P1 und RSF-P2 liegen in der Interregion zwischen dem repB- und dem repA-Gen. Dabei ist der RSF-P1-Promotor direkt hinter dem repB-Gen lokalisiert und der RSF-P2-Promotor direkt vor dem repA-Gen. Ein Vergleich der -35- und -10-Region mit den Consensus-Sequenzen (siehe Tabelle 4) deutet darauf hin, daß der RSF-P1-Promotor wesentlich stärker als der RSF-P2-Promotor ist. Bestätigt wird dies durch RNA-Polymerase-Bindungsstudien, bei denen die RNA-Polymerase wesentlich häufiger in der Region der RSF-P1-Stelle bindet als in der von RSF-P2 (7).

In einem Abstand von ungefähr 120 Basenpaaren folgen dem repC-Gen abwärts zuerst ein potentieller Transkriptionsterminator und dann der Promotor RSF-P3. Der Transkriptionsterminator (siehe Abb.17) besteht aus einem G- und C-reichen Abschnitt mit einer ausgeprägten Zweifach-Symmetrie gefolgt von einer langen T-reichen Nukleotid-Strecke, was die Merk-

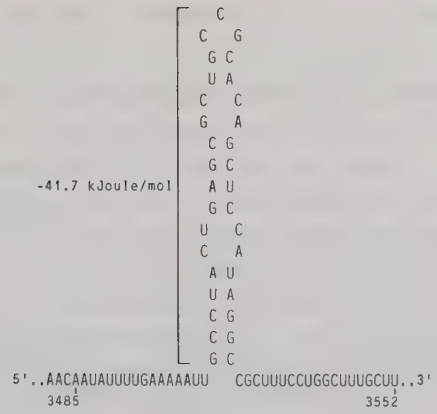


Abb.17

Potentielle Sekundärstruktur der mutmaßlichen Transkriptionsterminations-Region. Der gezeigte Sequenzausschnitt liegt ca. 120 Nukleotide hinter dem Strukturgen für das RepC-Protein und besitzt die charakteristischen Merkmale eines rho-unabhängigen Terminators (83, 89). Die palindromartige Sequenz vor der möglichen Terminationsstelle (U-reiche Region) ist als Bäumchen-Struktur dargestellt. Die Berechnung der freien Energie dieser Struktur erfolgte nach der Methode von Tinoco et al. (87) unter Verwendung der verbesserten Parameter von Borer et al. (88). Die Zahlen unterhalb der Sequenz beziehen sich auf die Nukleotidpositionen in Abb.8.

male eines rho-unabhängigen Transkriptionsterminators sind (83,89). Der Promotor RSF-P3, der von der Effektivität ähnlich stark wie der RSF-P1-Promotor ist (7), würde nach seiner Orientierung die Transkription der Resistenzgene von RSF1010 beeinflussen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß nach der Promotor- und Transkriptionsterminator-Organisation die Replikationsgene repA und C als Transkriptionseinheit (Operon) gelesen werden. Der Promotor, der für die Transkription des repB-Gens verantwortlich ist, müßte nach den RNA-Polymerase-Bindungsstudien zwischen der oriV- und mob-Region liegen (7,90). Ein zweiter potentieller Transkriptionsterminator konnte weder in der zu dem repB-Gen aufwärts vorkommenden Region noch in der Intergenregion gefunden werden. Damit be-

steht die Möglichkeit einer weiteren Operonstruktur, in der die Replikationsgene repA, B und C enthalten sind.

4.4. Codongebrauch und Aminosäurezusammensetzung

Die Tabelle 5 zeigt den Codongebrauch der Replikationsgene repA, B und C. Dabei ist zu erkennen, daß anstelle der synonymen Tripletts bevorzugt die Tripletts in den Strukturgenen zu finden sind, die mit G oder C in der dritten Position enden. Aufgrund dieser Tatsache ergibt sich ein G+C -Gehalt der 3580 Nukleotide langen Gesamtsequenz von 64%. Das P.putida-Chromosom weist einen ähnlichen Wert von 63% auf (93), wohingegen das E.coli-Chromosom einen G+C -Gehalt von nur 51% besitzt.Daher stammt RSF1010 vermutlich eher aus bestimmten Pseudomonaden-Arten als aus E.coli.

In der vorgestellten Gesamtsequenz von RSF1010 gibt es zwei Regionen, die einen auffällig niedrigen G+C -Gehalt besitzen. Der eine Bereich (Nukleotide 1187 bis 1497) ist in der Zwischenregion lokalisiert mit einem G+C -Gehalt von 52%. Der andere Bereich (Nukleotide 3375 bis 3580) ist abwärts von dem repC-Gen gelegen mit einem G+C -Gehalt von nur 41%. Beide Regionen zeichnen sich durch das Vorkommen von Transkriptionssignalstrukturen aus (siehe unter 4.3.), womit anscheinend auch ein erhöhter A+T -Gehalt verbunden ist.

Die Aminosäurezusammensetzung der drei sich aus der Nukleotidsequenz ergebenden Replikationsproteine zeigt für das RepA-Protein 4 überschüssige positive Ladungen, für das RepB-Protein 12 und für das RepC-Protein 21 (siehe Tabellen 6 und 7). Damit ist das RepC-Protein das basischste Protein unter den drei Replikationsproteinen von RSF1010 und unter den bisher bekannten Plasmid-kodierten Replikationsproteinen (wie z.B. pSC101, R6K, λdv, P1, F, Rts1 und RK2) (110). Das Replikationsprotein RepA besteht aus 278 Aminosäuren, das RepB-Protein aus 322 und das RepC-Protein aus 282. Die entsprechenden Molekularmassen betragen 29.8 kDa, 35.8 kDa und 30.9 kDa. Die Werte, die durch eine $NaDodSO_4$/Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhalten wurden, ergaben für das RepA-

Tabelle 5: Codon gebrauch

	repA	repB	repC
Start: ATG/GTG	1/0	1/0	0/1
Ala : GCT/GCC/GCA/GCG	3/25/6/5	2/29/6/7	6/9/4/16
Arg : CGT/CGC/CGA/CGG/AGA/AGG	1/10/0/6/0/2	1/14/2/12/0/5	1/8/3/12/2/0
Asn : AAT/AAC	1/5	2/5	2/4
Asp : GAT/GAC	4/10	5/16	4/10
Cys : TGT/TGC	0/1	1/1	2/2
Gln : CAA/CAG	2/9	0/21	4/8
Glu : GAA/GAG	7/10	8/17	5/11
Gly : GGT/GGC/GGA/GGG	8/14/0/6	5/17/0/3	4/18/2/6
His : CAT/CAC	4/5	1/4	4/5
Ile : ATT/ATC/ATA	3/10/0	1/6/1	0/9/1
Leu : TTA/TTG/CTT/CTC/CTA/CTG	0/1/1/3/0/22	0/2/3/6/0/16	0/2/3/4/2/18
Lys : AAA/AAG	1/ 7	1/16	1/15
Met : ATG	9	10	3
Phe : TTT/TTC	0/9	2/4	1/6
Pro : CCT/CCC/CCA/CCG	1/9/1/8	1/5/3/5	3/6/2/7
Ser : TCT/TCC/TCA/TCG/AGT/AGC	1/2/0/3/0/10	0/1/1/0/1/14	0/1/0/1/1/7
Thr : ACT/ACC/ACA/ACG	0/5/0/2	1/9/0/3	0/4/0/2
Trp : TGG	4	4	5
Tyr : TAT/TAC	1/3	4/3	2/5
Val : GTT/GTC/GTA/GTG	1/4/1/12	0/6/1/8	0/7/3/9
Stop : TAA/TAG/TGA	1/0/0	0/1/0	0/0/1

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung der Rep-Proteine

Aminosäure	RepA	RepB		RepC
		Mol Prozent		
Ala	14.03	13.67	(14.60)	12.41
Arg	6.83	10.56	(9.94)	9.23
Asn	2.16	2.17		2.13
Asp	5.04	6.52	(8.70)	4.96
Cys	0.36	0.62	(n.t.)	1.42
Gln	3.96	6.52		4.26
Glu	6.12	7.76	(13.66)	5.67
Gly	10.07	7.76	(7.76)	10.64
His	3.24	1.55	(1.55)	3.19
Ile	4.68	2.48	(2.48)	3.55
Leu	9.71	8.39	(8.70)	10.28
Lys	2.88	5.28	(4.97)	5.67
Met	3.24	3.11	(3.11)	1.06
Phe	3.24	1.86	(1.55)	2.48
Pro	6.83	4.36	(4.97)	6.38
Ser	5.75	5.28	(5.59)	3.55
Thr	2.51	4.04	(4.04)	2.13
Trp	1.44	1.24	(n.t.)	1.77
Tyr	1.44	2.17	(2.17)	2.48
Val	6.47	4.66	(4.04)	6.74

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Aminosäuresequenz, die sich aus der DNA-Sequenz ergibt. Die Werte in Klammern wurden durch Analyse der nach einer sauren Totalhydrolyse des gereinigten Proteins freigewordenen Aminosäuren ermittelt; die Aminosäuren Cystein und Tryptophan werden dabei nicht erfaßt (siehe unter Methodik 3.8.3.). Die Gesamtzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins wurde gleich 100% gesetzt. Die Anzahl der jeweiligen Aminosäuren wurde relativ dazu gesetzt.

Tabelle 7: Charakteristische Merkmale der Rep-Proteine

	RepA	RepB	RepC
Masse, kDa	29,776	35,769	30,893
Gesamtanzahl der Aminosäuren	278	322	282
Anzahl der positiven Ladungen	35	56	51
Anzahl der negativen Ladungen	31	44	30
Netto-Ladung	4+	12+	21+
α-Helix-Anteil, %	28	31	22
ß-Faltblatt-Anteil, %	8	4	5
Anteil sonstiger Strukturen, %	64	65	73

Die angegebenen Werte wurden anhand der sich aus der DNA-Sequenz ergebenden Aminosäuresequenz ermittelt. Die Ergebnisse der N- und C-terminalen Analyse der Proteine wurden mitberücksichtigt.

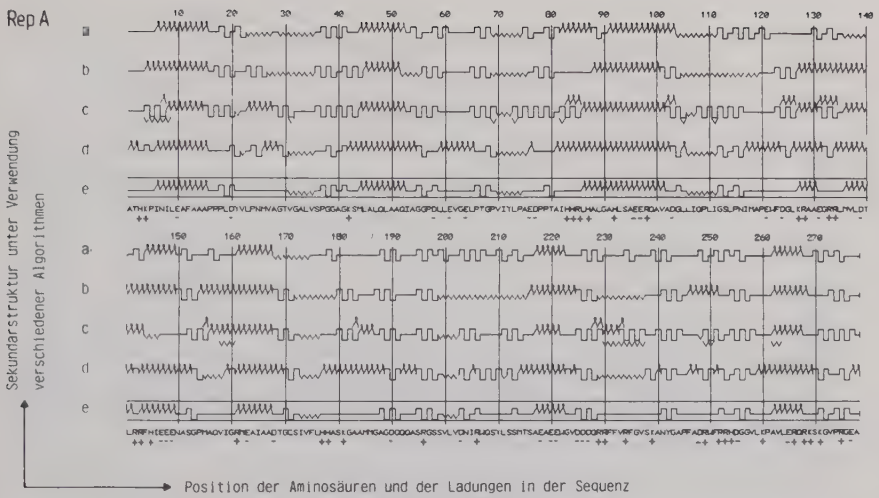
Protein 29 kDa, für das RepB-Protein 40 kDa und für das RepC-Protein 27 kDa. Die Abweichungen der durch NaDodSO$_4$/Polyacrylamidgel-Elektrophorese ermittelten Molekularmassen des RepB- und RepC-Proteins könnten durch anomales Binden von SDS an das Protein, durch eine atypische Konformation des Protein-SDS-Komplexes oder durch ungewöhnliche in der SDS-Lösung erhalten bleibende Eigenschaften des nativen Pro-

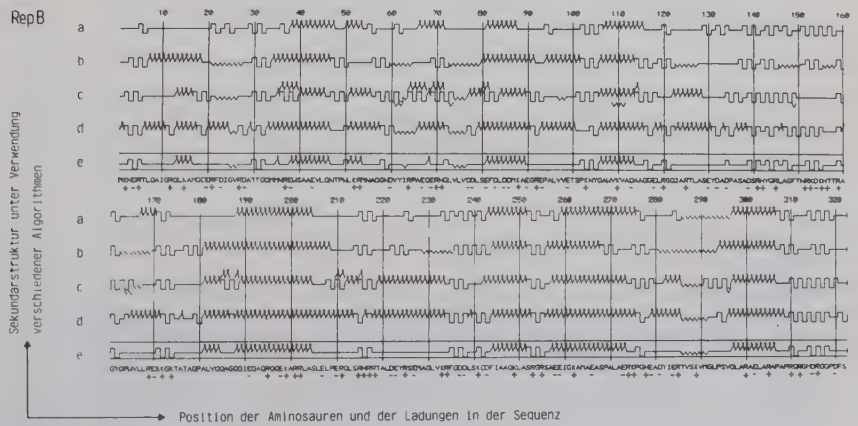
teins erklärt werden. (92).

Bei den Replikationsproteinen RepA und RepC wird nach der Translation das Formyl-Methionin abgespalten, wodurch das RepA-Protein mit Alanin und das RepC-Protein mit Valin anfängt (siehe Abb.8). Am Carboxy -Ende des RepB-Proteins wird wahrscheinlich das Methionin entweder nicht eingebaut oder nach der Translation abgespalten (siehe unter 4.2.), d.h. RepB hört wahrscheinlich mit Serin auf.

Die Voraussagen der Sekundärstrukturen für die Replikationsproteine sind in der Abb.18 zu sehen. Eine Untersuchung der vorausgesagten Sekundärstrukturen (69) läßt erkennen, daß bei dem RepA-Protein in dem vorderen 2/3-Abschnitt (Aminosäure-Position 1-185) der überwiegende Teil an α-Helix- und ß-Faltblatt-Strukturen, die unterbrochen sind durch ausgeprägte Richtungsänderungen (ß-turns), lokalisiert ist. Dort können z.B. die Faltblatt-Strukturen untereinander in Wechselwirkung treten und dem Molekül eine spezifische räumliche Faltung und damit eine spezifische enzymatische Aktivität verleihen. Auffallend ist auch das stark positiv geladene Carboxy -Ende des RepA-Proteins. Das RepB-Protein scheint von allen drei Replikationsproteinen den größten Anteil an α-Helix-Strukturen zu besitzen, die über das ganze Molekül annähernd gleichmäßig verstreut sind (siehe Tabelle 7, Abb.18). Das RepC-Protein enthält einen Schwerpunkt an α-Helix-Strukturen innerhalb der Aminosäure-Positionen 90 und 145. Das NH_2-Ende des RepC-Proteins weist einen großen Überschuß an positiven Ladungen auf. In dem RepC-Protein befinden sich 4 Cystein-Moleküle, die eventuell durch Disulfid-Brücken untereinander in Verbindung stehen und damit die Tertiärstruktur beeinflussen könnten.

Eine Hydrophobizitätsanalyse der Replikationsproteine (siehe Abb.19) nach der Methode von Kyte und Doolittle (68) ergibt einen Hydrophobizidätsdurchschnittswert, der auf die gesamte Aminosäurezusammensetzung bezogen ist, für das RepA-Protein von -0.094, für das RepB-Protein von -0.740 und für das RepC-Protein von -0.384. Zum Vergleich sei erwähnt, daß der


Rep A
Sekundarstruktur unter Verwendung verschiedener Algorithmen
a
b
c
d
e
Position der Aminosäuren und der Ladungen in der Sequenz


Rep B
Sekundarstruktur unter Verwendung verschiedener Algorithmen
a
b
c
d
e
Position der Aminosäuren und der Ladungen in der Sequenz

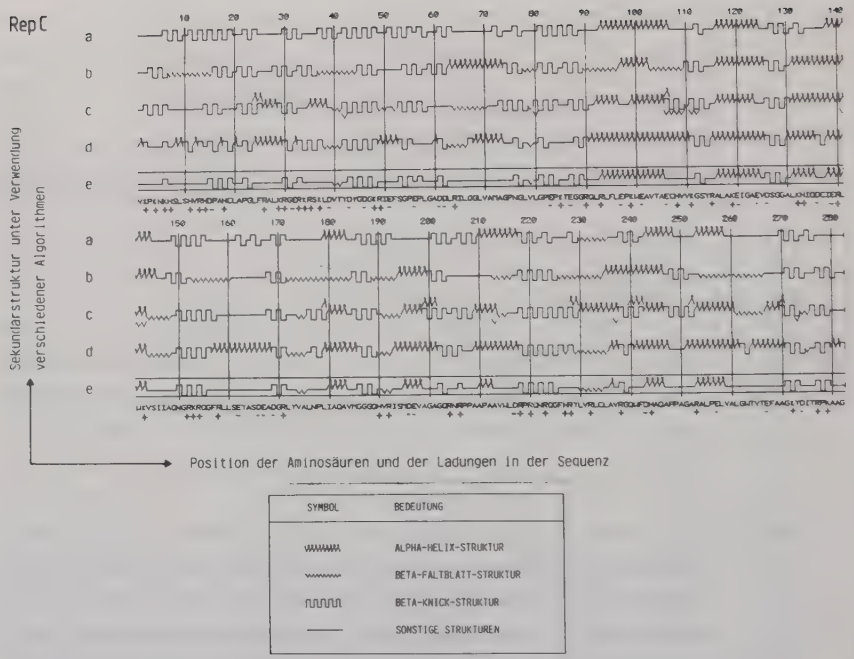
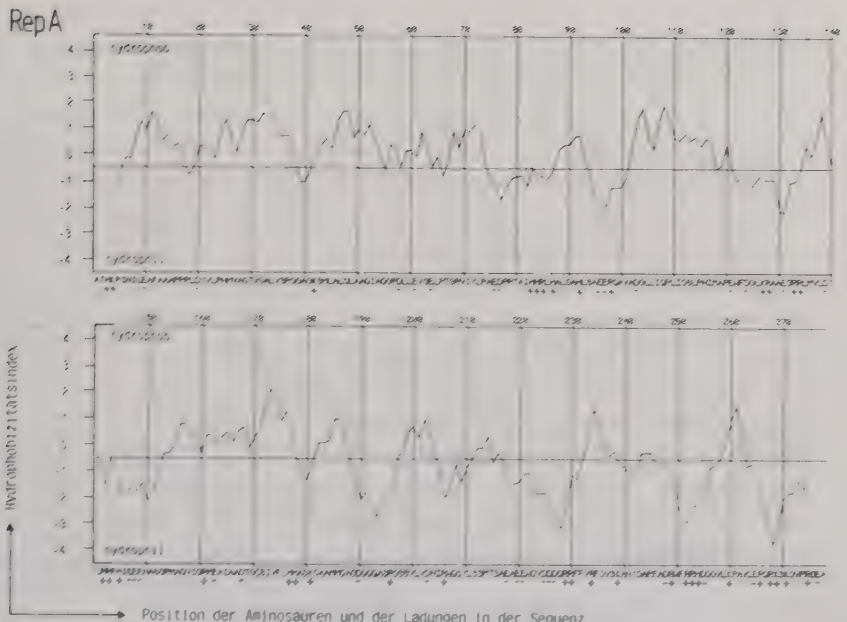
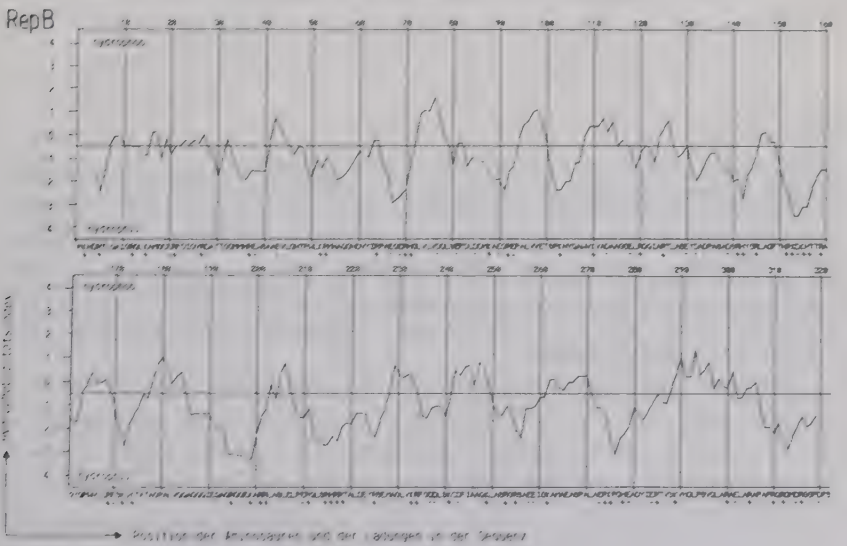


Abb. 18

Diagramme der vorausgesagten Sekundärstrukturen der RSF1010 Rep-Proteine. Die Berechnungen wurden nach den Algorithmen von (a) Burgess et al.(100), (b) Chou und Fashman (101,102), (c) Nagano (103), und (d) Robson und Suzuki (104) durchgeführt. In Linie e geben drei der vier (a-d) Berechnungen eine Übereinstimmung in den Voraussagen. Bei einer nicht eindeutigen Voraussage des entsprechenden Algorithmus wurden alle Sekundärstrukturen, die in dieser Region auftreten könnten, angegeben. Ferner sind die Positionen der Ladungen unterhalb der Aminosäuresequenz der einzelnen Polypeptide angegeben. Weitere Erläuterungen siehe Text.


RepA
Position der Aminosäuren und der Ladungen in der Sequenz


RepB

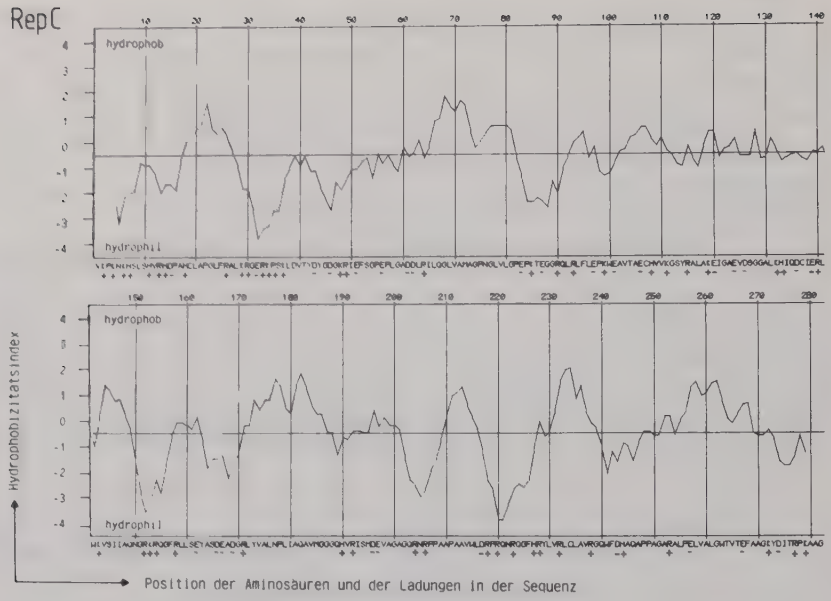


Abb. 19

Hydrophobizitäts-Profile der RSF1010 Rep-Proteine. Die Berechnung der Hydrophobizitätswerte erfolgte nach der Methode von Kyte und Doolittle (68). Positive Indizes zeigen Sequenzregionen mit hydrophobem Charakter, negative solche mit hydrophilem Charakter an. Die in der Mitte waagerecht durchgezogene Linie entspricht dem bei den meisten bislang sequenzierten Proteinen gefundenen Hydrophobizitätsgesamtdurchschnittswert. Ebenfalls angezeigt sind die Positionen der Ladungen innerhalb der einzelnen Polypeptidsequenzen.

Durchschnittswert von Membran-eingebetteten Proteinen 0 bis 1, der von Zytoplasma-löslichen Proteinen 0 bis -1 beträgt (68). Charakteristisch für das RepA-Protein ist der Bereich zwischen den Aminosäure-Positionen 5 und 55, wo der Durchschnittswert zwischen 0 und 1 mehr in dem hydrophoben Bereich liegt. Überall dort, wo beim RepA-Protein ß-Faltblatt-Strukturen erscheinen, ist der Hydrophobizitätswert zwischen 0 und 1 zu finden. Das RepB-Protein verhält sich ausgesprochen hydrophil und zwar mit wenigen Ausnahmen fast über die gesamte Länge des Moleküls. Das RepC-Protein ist in ausgeprägt hydrophile und hydrophobe Bereiche unterteilt (siehe Abb.19). Am Amino-Terminus des RepC-Proteins stimmen die stark hydrophilen Regionen mit den Regionen überein, die einen großen Überschuß an positiven Resten tragen. Das sich aus der Sekundärstruktur ergebende α-helikale Zentrum des RepC-Proteins (Abb.18, Aminosäure-Position 100 bis 140) befindet sich in einem Bereich, der einen Hydrophobizitätsdurchschnittswert von 0 besitzt.

4.5. Homologievergleiche der Replikationsproteine von RSF1010 mit bekannten Replikationsproteinen und anderen mit der DNA in Wechselwirkung tretende Proteine

Um mögliche strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Replikationsproteinen zu finden, wurden die Aminosäuresequenzen der Proteine RepA (6), B und C mit den folgenden Replikationsproteinen mit bekannter Sequenz verglichen: RK2-P282 (93), pSC101-RepA (33), pC194-A (94), dnaA (95), λ-O (95), pT181-RepC (96), R6K- π (26,98), dnaB (97), P22-Gen 12 (99), T7-Gen 4A (95), sowie dnaG (95).

In einer ersten Analyse auf Homologie wurden die Replikationsproteine von RSF1010 mit den Proteinen verglichen, die für die Replikation verschiedener DNA-Einheiten (Replika) essentiell sind und spezifisch mit dem vegetativen Replikationsursprung interagieren (siehe Tabelle 8). Das Ergebnis zeigt, daß unter diesen Replikationsproteinen keine signifikante Homologie besteht. Daraus folgt, daß jedes Protein

Tabelle 8: Standardabweichungswerte (S.D.-Einheiten) nach einem statistischen Homologievergleich zwischen den Rep-Proteinen von RSF1010 und den Initiationsproteinen anderer Replikons

	RSF1010-RepB	RSF1010-RepC	RK2-P282	pSC101-RepA	pC194-A	dnaA	λ-O	pT181-RepC	R6K-π
RSF1010-RepA	0.599	2.172	1.152	-0.653	2.498	0.490	-0.362	0.435	0.839
RSF1010-RepB		-0.823	1.477	0.351	-0.268	2.600	0.690	-0.050	0.688
RSF1010-RepC			0.827	-1.143	-0.436	-0.557	0.418	2.176	0.853
RK2-P282				2.479	0.112	0.695	-0.776	-0.081	1.547
pSC101-RepA					-0.732	0.301	1.243	-1.046	2.389
pC194-A						2.276	-0.789	0.609	1.080
dnaA							0.177	1.528	0.315
λ-O								-0.230	-0.493
pT181-RepC									0.839

Die Suche wurde mit Hilfe einer Mutationsdaten-Matrix des Programms RELATE (105) durchgeführt. Die Segmentlänge betrug 20 Aminosäuren. Die Anzahl der Zufallsläufe pro Vergleich war 50. Qualitätswerte, die größer als 3 S.D.-Einheiten sind, zeigen eine signifikante Homologie zwischen zwei Proteinen an (67).

Tabelle 9: Homologievergleich zwischen den Rep-Proteinen und den Proteinkomponenten des Primosoms einiger anderer Replikons

	P22-Gen 12	RSF1010-RepB	RSF1010-RepA	RSF1010-RepC	dnaG	T7-Gen 4A
dnaB	22.316	0.954	0.907	-1.974	1.999	3.384
P22-Gen 12		0.253	4.154	0.448	-0.292	3.040
RSF1010-RepB			0.276	-1.092	0.921	2.048
RSF1010-RepA				2.410	0.817	1.981
RSF1010-RepC					0.804	-0.942
dnaG						3.122

Anmerkungen zum statistischen Vergleich sind in der Tabelle 8 zu finden.

aufgrund seiner einmalig vorkommenden Animosäuresequenz die Möglichkeit besitzt, spezifisch mit dem vegetativen Replikationsorigin seines Replikons in Wechselwirkung treten zu können.

In einem zweiten Homologievergleich wurden die Replikationsproteine von RSF1010 mit den Proteinen auf Ähnlichkeiten untersucht, die einen Primer setzen oder an der Primosomenbildung beteiligt sind. Danach besteht zwischen folgenden Replikationsproteinen eine signifikante Homologie (Tabelle 9): P22-Gen12 und RSF1010-RepA, P22-Gen12 und dnaB, P22-Gen12 und T7-Gen 4A, dnaB und T7-Gen 4A, sowie dnaG und T7-Gen 4A.

Dabei ist die Homologie mit großer Wahrscheinlichkeit auf enzymatische Gemeinsamkeiten zurückzuführen. Diese Gemeinsamkeiten findet man z.B. in der ATPase-Aktivität des dnaB- (97,106,107), des P22-Gen12- (108), und des RSF1010-RepA-Proteins (Scherzinger, unveröffentlichte Daten) oder beim Setzen eines Primers entweder durch das T7-Gen 4A-Protein (109) oder durch das dnaG-Protein (106,107). Das letztere Protein wiederum tritt in Wechselwirkung mit dem dnaB- (106,107) oder dem P22-Gen12-Protein (108). In Abb.20 ist einmal die starke Homologie zwischen dem P22-Gen12- und dem dnaB-Protein und zum anderen die etwas schwächere aber trotzdem signifikante Homologie zwischen dem P22-Gen12- und dem RSF1010-RepA-Protein gezeigt. Bei dem P22-Gen12- und dem dnaB-Protein bezieht sich die Aminosäuresequenz-Homologie auf 8 Polypeptid-Segmente, wohingegen es bei dem P22-Gen12- und dem RSF1010-RepA-Protein nur 5 sind. Werden die Replikationsproteine P22-Gen12, RSF1010-RepA und dnaB in einer Reihe nach den zueinander homologen Polypeptid-Segmenten angeordnet, so tritt eine für alle drei Proteine gemeinsame Region auf (siehe Abb. 20 und 21). Bei dem RepA-Protein von RSF1010 zeichnet sich dieser Bereich besonders durch Sekundärstrukturen wie α-Helix, ß-Faltblatt und Richtungsänderungen (ß-turns) aus (siehe auch unter 4.4., Abb.18).

Da alle drei Proteine eine ATPase-Aktivität besitzen ist an-

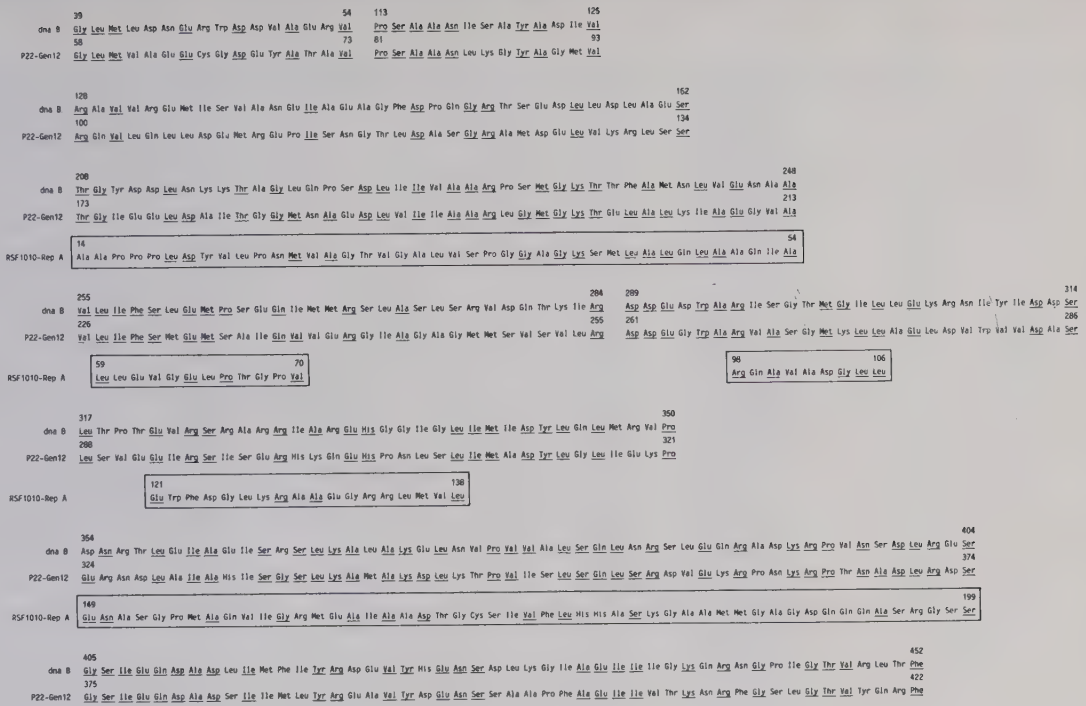


Abb. 20

Homologievergleich zwischen dem RSF1010-RepA-, dem P22-Gen 12- (99) und dem E.coli-dnaB-Protein (97). Die Homologievergleiche wurden mit Hilfe der Fortran-Programme RELATE (65) und ALIGN (66) durchgeführt. Die homologen Polypeptid-Segmente des RepA-Proteins sind durch Einrahmung hervorgehoben. Die Zahlenwerte über den gezeigten Sequenzausschnitten geben Aminosäurepositionen an. Innerhalb der linearen Anordnung der drei verschiedenen Proteine untereinander sind diejenigen Aminosäuren unterstrichen, die in zwei oder allen drei Sequenzen übereinstimmen.

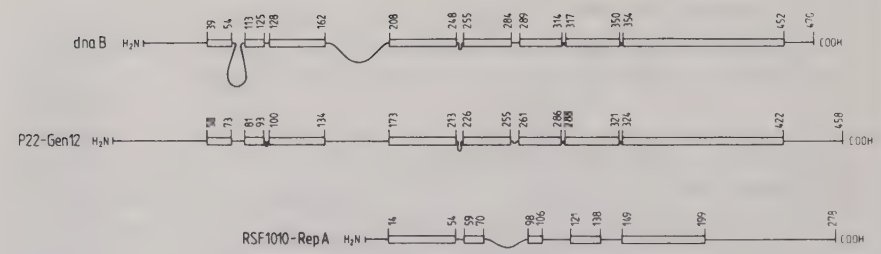


Abb. 21

Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zwischen dem RSF1010-RepA-, dem P22-Gen 12- und dem E.coli-dnaB-Protein als Diagramm gezeigt. Polypeptid-Segmente, die untereinander Homologien in der Aminosäuresequenz aufweisen, sind als offene Balken dargestellt. Die Zahlen geben Aminosäure-Positionen an.

zunehmen, daß sich in dieser gemeinsamen Region die ATPase-Domäne befindet. In den Regionen, wo das P22-Gen12- nur mit dem dnaB-Protein homolog ist, könnte die Protein-Protein-Interaktionsstelle für das dnaG-Protein sein. Sowohl für die E.coli-Chromosomen-Replikation wie für die P22- DNA-Replikation wird das dnaG-Protein benötigt (106,107,108), das mit den beiden oben genannten Proteinen interagiert.

Aus DNA-Protein-Bindungsstudien ist bekannt, daß das RepC-Protein von RSF1010 Sequenz-spezifisch den vegetativen Replikationsursprung von RSF1010 erkennt (11). Aus diesem Grund wurde das RepC-Protein von RSF1010 mit bekannten Proteinen auf Homologie verglichen, von denen die mit der DNA in Wechselwirkung tretenden Domänen bekannt sind. Zu diesen Proteinen, die die Genexpression regulieren, gehören der λ-Repressor, das CAP-Protein von E.coli und das λ-Cro-Protein (111). Aus der Röntgenstrukturanalyse der oben genannten Proteine konnten besondere gemeinsame Merkmale (Domänen) festgestellt werden (111). Zu diesen besonderen Merkmalen gehört eine α-Helix-Struktur (α_2-Helix), die in der großen Furche (major groove site) der DNA eingebettet ist und spezifisch mit der DNA wechselwirkt. Diese helikale

Struktur ist Teil einer strukturell konservierten bihelikalen Einheit. Ein zweiter α-Helix-Bereich (α_1-Helix) bestimmt nicht direkt die spezifische Wechselwirkung, sondern übt einen nicht-spezifischen Kontakt am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA aus. Die bihelikale Struktur mit α_1-Helix, Richtungsänderung (ß-turn) und α_2-Helix ergibt eine spezifische räumliche Anordnung, die zu der oben beschriebenen Interaktion mit der DNA führt (111, 112). Zusätzlich konnte festgestellt werden, daß einige Aminosäuren in dieser Region konserviert sind. Ein Domänen-Vergleich dieser regulatorischen DNA-bindenden Proteine mit dem RepC-Protein von RSF1010 zeigt auffallende Homologien hinsichtlich der Primär- und Sekundärstruktur (siehe Abb.22). Somit scheint der Bereich innerhalb der Aminosäure-Positionen 111 und 130 (siehe auch

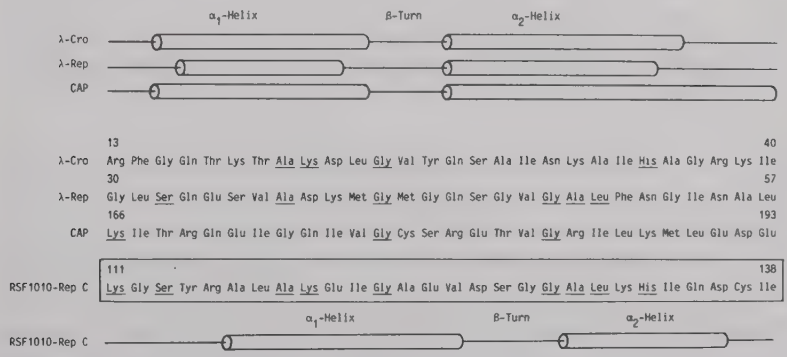


Abb. 22

Vergleich der bihelikalen Einheit des RepC-Proteins mit denen von drei regulatorischen DNA-Bindungsproteinen. Die Sekundärstruktur der bihelikalen RepC-Domäne wurde unter Verwendung der in Abb.18 angegebenen Algorithmen vorausgesagt. Die Strukturen der konservierten bihelikalen Einheiten des λ-CI-Repressors, des λ- Cro-Proteins und des CAP-Proteins sind durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt worden (111). Die Aminosäuresequenzen dieser Abschnitte wurden durch lineare Anordnung untereinander auf Homologie verglichen. Dabei sind die jeweiligen Aminosäuren unterstrichen, die mit denen der RepC-Sequenz übereinstimmen. Die Zahlen über der Aminosäuresequenz geben die intramolekulare Position der bihelikalen Einheiten an.

unter 4.4., Abb.18) des RepC-Proteins für eine spezifische Wechselwirkung mit der DNA in Frage zu kommen.

Ferner wurde auch eine Ähnlichkeit des RepC-Proteins mit eukaryontischen DNA-bindenden Proteinen (HMG-Proteine) und dem kleinen DNA-bindenden Protein des Archaebakteriums Sulfolobus solfataricus festgestellt (siehe Abb.23) (113), wobei sich der Vergleich auf die NH_2-terminalen Aminosäuren beschränkte. Die Proteine sind charakterisiert durch Lysin-Reste am NH_2-Terminus, die in einer alternierenden Ordnung x-Lys-x-Lys-x-Lys-x (x steht für eine beliebige Aminosäure) erscheinen. Bei den eukaryontischen HMG-Proteinen (high mobility group) wird angenommen, daß die Lysin-Reste am NH_2-Terminus wichtig sind für die Interaktion mit der DNA (113). Das basische Protein der Gruppe Ib von dem Archaebakterium Sulfolobus solfataricus mit einer Molekularmasse von 7 kDa zeichnet sich dadurch aus, daß es mit der DNA

	2	4	6	8	10
S.solfataricus-Ib	Val	Lys	Val	Lys	Phe	Lys	Tyr	Lys	Gly	Glu
	2	4	6	8	10
H6	Pro	Lys	Arg	Lys	Ser	Ala	Thr	Lys	Gly	Asp
	2	4	6	8	10
HMG-1	Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Gly	Gly
	2	4	6	8	10
HMG-2	Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Asp	Lys	Pro	Arg	Gly
	2	4	6	8	10
HMG-14	Pro	Lys	Arg	Lys	Val	Ser	Ser	Ala	Glu	Gly
	2	4	6	8	10
HMG-17	Pro	Lys	Arg	Lys	Ala	Glu	Gly	Asp	Ala	Lys
	2	4	6	8	10
RSF1010-Rep C	Val	Lys	Pro	Lys	Asn	Lys	His	Ser	Leu	Ser

Abb. 23

Vergleich der N-terminalen Region des RepC-Proteins mit der von einigen anderen Bindungsproteinen. In der linearen Anordnung der verschiedenen Sequenzen untereinander sind die Lysinreste in den Positionen 2, 4, 6, 8 und 10 unterstrichen. H6, HMG-1, HMG-2, HMG-14, HMG-17: eukaryontische Nicht-Histonchromatinproteine (113); S.solfataricus-Ib: DNA-Bindungsprotein der Gruppe Ib des Archaebakteriums Sulfolobus solfataricus (113).

unspezifisch wechselwirkt und zirkuläre DNA faltet (Reinhardt und Dijk, persönliche Mitteilung).

Nach den oben beschriebenen Homologievergleichen besitzt das RepC-Protein wahrscheinlich zwei Domänen, die mit der DNA in Kontakt treten können. Dabei interagiert die eine Domäne unspezifisch und die andere Domäne spezifisch mit der DNA. Die sich am NH_2-Terminus befindliche Domäne des RepC-Proteins ist zusätzlich charakterisiert durch einen großen Überschuß an positiven Ladungen (siehe unter 4.4.), wodurch wahrscheinlich die unspezifische Wechselwirkung mit der DNA noch verstärkt wird.

4.6. Definition der oriV-Region, die als minimales DNA-Segment für die Initiation der RSF1010-Plasmid-Replikation in vitro und in vivo essentiell ist

Der Ursprung der vegetativen Replikation (oriV) wurde vorher mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kartiert (6,12) und ist lokalisiert in dem Bereich um die RSF1010-Koordinate 2.6 (siehe Abb.1). Aufgrund von Replikationsanalysen, molekularen Klonierungs- und Komplementationsexperimenten (6,10) ist bekannt, daß dieser Bereich innerhalb des 1043 bp großen PvuII/HinfI-Fragments [1.95-3.0] liegt. Mit dem Ziel das minimale RSF1010-Fragment mit der Origin-Funktion zu definieren, wurde zuerst das 2495 bp-große PvuII/PstI-Fragment von pKT228 (RSF1010:Tn3), das das 1043 bp-große PvuII/HinfI-Fragment trägt, in die HincII/PstI-Klonierungsstelle der Phagenvektoren M13mp8 und M13mp9 insertiert. Die daraus resultierenden hybriden Phagen M13 oriV8 bzw. M13 oriV9 wurden mit PstI bzw. BamHI linearisiert, mit der Exonuklease Bal31 verdaut und mit BamHI bzw. PstI nachgeschnitten. Die mit Deletionen versehenen Inserts wurden präparativ von dem Vektorrest getrennt und wieder in die entsprechende HincII/BamHI- bzw. HincII/PstI-Klonierungsstelle eines intakten Phagen-Vektors M13mp8 bzw. M13mp9 insertiert. Die erhaltenen chimären Phagen wurden einmal als SS-DNA's für die DNA-Sequenzierung verwendet und zum anderen als Duplex-RF-DNA's auf Template-Aktivität in einem in vitro - System, be-

stehend aus einem partiell gereinigten E.coli-Extrakt und den drei RSF1010-kodierten Proteinen RepA, B und C, getestet. In diesem RSF1010-spezifischen in vitro-System wird nur der Origin von RSF1010 und nicht der von M13 benutzt, da der letztere das nicht zur Verfügung stehende Gen II-Protein von M13 für die Vermehrung der replikativen DNA-Form benötigt. Die Sequenzierungsstrategie ist in Abb.24 und die DNA-Sequenz des 1043 bp-großen PvuII/HinfI-Fragments in Abb.25 gezeigt. Die Replikationseigenschaften der chimären Phagen-DNAs, die das mit Deletionen versehene oriV-Fragment von RSF1010 enthalten, sind in der Abb.26 und in der Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10: In vitro-Replikationsaktivität von Deletions-tragenden oriV-Fragmenten von RSF1010

Template DNA	DNA-Synthese pmol
M13 oriV9Δ0 RF	1110
M13 oriV9Δ2 RF	987
M13 oriV9Δ15 RF	1015
M13 oriV9Δ122 RF	10
M13 oriV8Δ81 RF	7
M13 oriV8Δ55 RF	662
M13 oriV8Δ78 RF	650
M13 oriV8Δ85 RF	980
M13 oriV8Δ54 RF	956
- DNA	7

Die Reaktionsbedingungen waren wie unter Methodik (Abschnitt 3.9.2) beschrieben.

Die Ergebnisse dieser Experimente grenzen die essentielle Komponente des RSF1010-Replikationsorigins auf ein 395 bp-großes Segment (siehe Abb. 25) zwischen den Nukleotiden 399

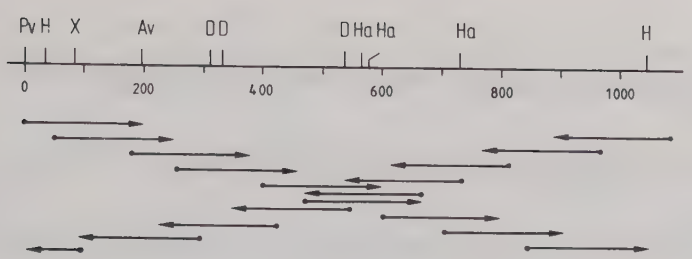


Abb. 24

Die für den Replikationsorigin von RSF1010 benutzte Sequenzierungsstrategie. Als Quelle für die Sequenzierung wurde das 2495 bp große PvuII/PstI- Fragment von pKT228 (RSF1010::Tn3) benutzt. Die Pfeile zeigen die Richtung der Dideoxysequenzierung sowie die Länge der bestimmten Teilsequenzen an. In der Restriktionskarte der sequenzierten RSF1010-Region sind folgende Endonuklease-Erkennungsstellen angegeben: Av,AvaI; D,DdeI; H,HinfI; Ha,HaeII; Pv,PvuII; X,XmnI. Die Zahlen unter der Restriktionskarte geben Nukleotidpaare an.

und 796 (Koordinate 2.3 bis 2.7 auf der Standardkarte von RSF1010) ein. Für einen in vivo-Test auf Origin-Aktivität wurden die verschieden großen Replikationsorigin-Fragmente von RSF1010 mit PstI und SmaI aus den rekombinanten M13-Phagen geschnitten, präparativ isoliert und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase mit einem 2570 bp-großen EcoRV/PstI-Fragment von pBR325 verknüpft, auf dem sich das Cm-Gen befindet. Der Ligationsansatz wurde dazu benutzt, einen pMMB2-tragenden E.coli C600-Stamm zu transformieren. Das Plasmid pMMB2 ist ein ColD-basierendes rekombinantes Plasmid, das die trans-wirkenden Replikationsproteine RepA, B und C liefert, aber dem der Replikationsorigin von RSF1010 fehlt (3,6,10). Kolonien, die nach der Transformation auf Chloramphenicol wuchsen, enthielten neben dem Helfer-Plasmid pMMB2 ein Satelliten-Plasmid, auf dem ein aktiver Replikationsorigin zu finden war (siehe Tabelle 11 und Abb.26).

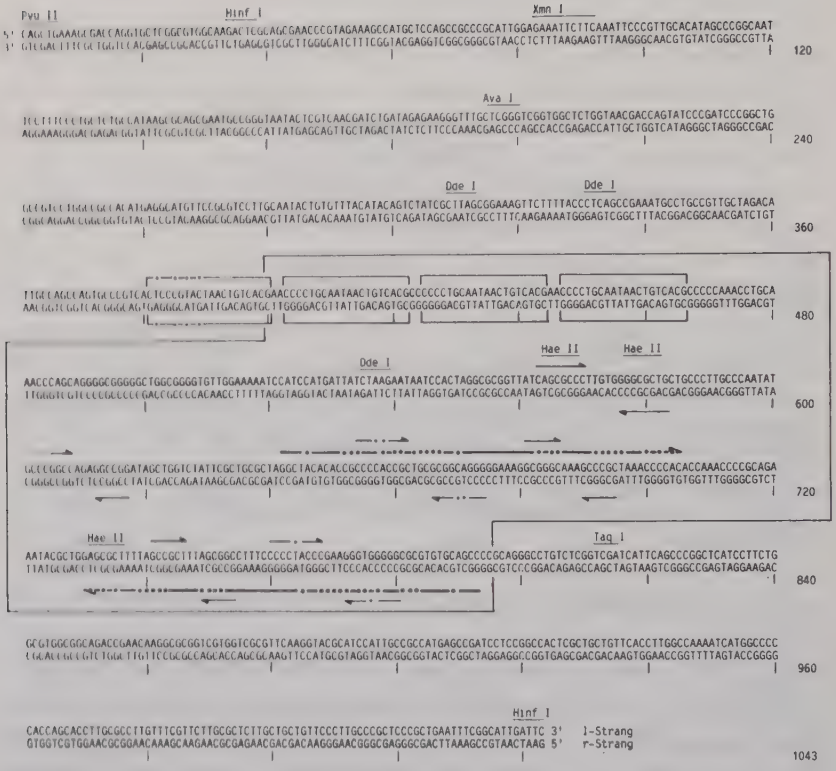


Abb. 25

Nukleotidsequenz des 1043 bp großen, den Replikationsorigin tragenden PvuII/HinfI-Fragments von RSF1010. Die Numerierung der Basenpaare beginnt mit dem ersten Nukleotid der PvuII-Erkennungsstelle (Koordinate 1.95 in Abb.1). Das große Fenster umschließt eine 395 bp große minimale Region, die sowohl in vivo als auch in vitro noch volle Origin-Aktivität besitzt. Die kleinen Fenster rahmen vier 20 bp große gerichtete Sequenzeinheiten, sogenannte direct repeats, ein, von denen drei perfekt konserviert sind. Palindromartige Sequenzen (inverted repeats) sind durch Pfeile angezeigt. Nukleotide, die von den strukturellen Merkmalen der direct oder inverted repeats abweichen, sind durch Punkte markiert. Der mit 'r' bezeichnete DNA-Strang kodiert für die rep-mRNA.

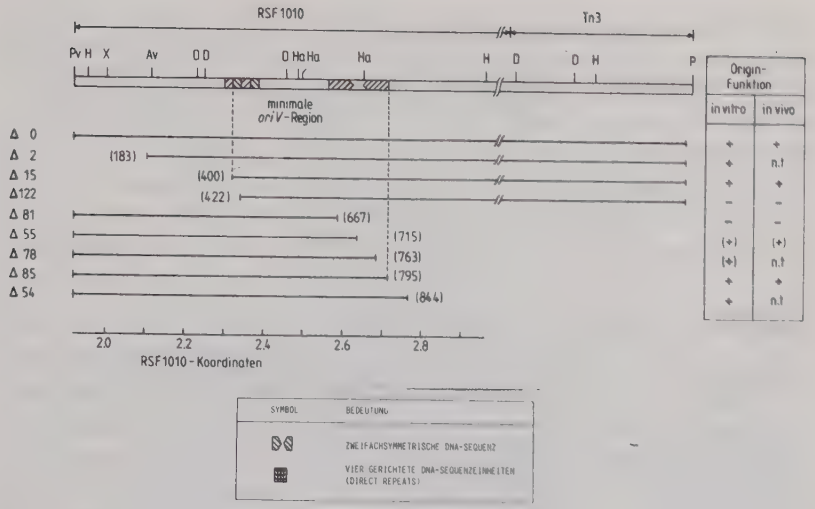


Abb.26

Struktur und Replikationsaktivität von klonierten Deletions-tragenden oriV-Fragmenten.
Oberer Teil: Struktur des aus dem Plasmid pKT228 (RSF1010::Tn3) stammenden 2495 bp großen PvuII/PstI-Fragments. Die durch gestrichelte Linien angezeigte miminale oriV-Region wurde aus den Daten in der Tabelle und der Deletionskartierung hergeleitet. Die angegebenen Restriktionsstellen sind wie folgt abgekürzt: Av,AvaI; D,DdeI; H,HinfI; Ha,HaeII; Pv,PvuII; X,XmnI. Die Bedeutung weiterer Symbole ist aus dem eingesetzten Fenster zu ersehen.
Unterer Teil: Struktur der durch Bal31-Verdauung erhaltenen Deletionsderivate des PvuII/PstI-Fragments. Die Zahlen in Klammern geben die Nukleotidpositionen der Deletionsendpunkte an und beziehen sich auf das in Abb.25 verwendete Numerierungssystem.
Tabelle: Replikationsaktivität der klonierten Deletions-tragenden oriV-Fragmente in vitro und in vivo. Superhelikale rekombinante Phagen-DNA's, die das PvuII/PstI-Fragment (Δ0) oder ein Deletionsderivat davon (Δ2-Δ54) enthielten, wurden wie in der Legende zu Tabelle 10 beschrieben auf Template-Aktivität in einem RSF1010-spezifischen in vitro-System getestet. Dabei wurde die in M13oriV Δ0 erhaltene Replikationsaktivität gleich 100% gesetzt. Die mit den anderen DNA's erhaltenen Aktivitäten wurden relativ dazugesetzt, wobei sich folgende drei Gruppen ergaben: -, <5% Aktivität; (+), 50-60% Aktivität; +, >85% Aktivität. Die in vivo-Tests auf

Origin-Aktivität wurden wie in der Legende zu Tabelle 11 beschrieben durchgeführt. Gemessen wurde die Anzahl der Transformanten, die nach Transformation von kompetenten E.coli C600 [pMMB2]-Zellen mit rekombinanter DNA, bestehend aus einem Marker-Gen und einem der gezeigten Deletionsderivate, erhalten wurden. Wie aus der Tabelle 11 ersichtlich ist, lieferte der Transformationstest auf Origin-Aktivität ebenfalls drei Gruppen, die folgendermaßen ausfielen: -, keine Cm^r-Transformanten; (+), ca. 10^3 Transformanten; +, ca. 10^5 Transformanten; n.t., nicht getestet.

Tabelle 11: Transformationstest auf Origin-Aktivität

Rezipient	transformierende DNA	Cm^r-Transformanten
C600(pMMB2)$^+$	pPSΔ15	0.5×10^5
C600(pMMB2)	pPSΔ122	< 1
C600(pMMB2)	pPSΔ85	1×10^5
C600(pMMB2)	pPSΔ55	6×10^2
C600(pMMB2)	pPSΔ81	< 1

Annähernd 10^9 kompetente C600(pMMB2)-Zellen wurden einem Ligationsgemisch (30 µl) ausgesetzt, das 1 pmol der angezeigten oriV-Fragmente und 1 pmol eines 2.3 kb-großen Cm-Fragments enthielt. $^+$pMMB2 ist ein auf ColD basierendes rekombinantes Plasmid, das die drei Replikationsgene von RSF1010, nicht aber dessen Replikationsorigin enthält.

Wie aus Abb.26 zu ersehen ist, stimmen die in in vivo- und in vitro-Daten vollständig überein. Eine Sonderstellung nimmt dabei das Deletions-tragende Replikationsorigin-Fragment Δ55 ein, das in vivo und in vitro eine Restaktivität aufweist (siehe Tabelle 10 und 11). Eine Erklärung dafür ergibt sich aus der möglichen Signalstruktur-Organisation der Replikationsorigin-Region (siehe Abb.25). Die auffallendsten Merkmale dieser Sequenz sind die Anwesenheit von 4 gerichteten 20 bp-großen Sequenzeinheiten (Nukleotide 381 bis 466) und einer 152 bp-großen Region mit einer ausgeprägten zweifachen Rotationssymmetrie (Nukleotide 642 bis 793). Die zu-

letzt erwähnte mögliche Signalstruktur ist von den gerichteten Sequenzeinheiten durch eine Region getrennt, die zwei kleine Palindrom-artige Sequenzen aufweist. Außerdem befindet sich in dieser trennend wirkenden Region eine 32 bp-lange G und C-reiche (81%) Nukleotid-Strecke (Nukleotide 483 bis 514) gefolgt von einer 31 bp-langen A und T-reichen (77%) Nukleotid-Strecke (Nukleotide 515 bis 545), wobei letzteres für die Mehrzahl der bisher bekannten Replikationsorigins charakteristisch ist (114).

Bei dem oben erwähnten Replikationsorigin-Fragment Δ55 fehlt die eine Flanke (Nukleotide 730 bis 793) der 152 bp-großen zweifach symmetrischen Nukleotidsequenz. Das Vorhandensein der anderen Flanke (Nukleotide 642 bis 705) und der aufwärts gelegenen Sequenz mit den 4 gerichteten Sequenz-Einheiten (direct repeats) mögen noch ausreichend sein, um eine geringe Restaktivität des Origins zu gewährleisten. Isoliert man aus E.coli-Zellen, die neben dem Helfer-Plasmid pMMB2 das Satelliten-Plasmid pPSΔ55 beherbergen, die Plasmid-DNA und trägt sie auf ein Agarosegel auf (Abb.27, Spur 1), so sind nur geringe Mengen der Satelliten-DNA zu erkennen. Zum Vergleich erhält man wesentlich größere Mengen an Satelliten-DNA, wenn sich darauf der intakte Replikationsorigin befindet, wie es z.B. bei den Satelliten-Plasmiden pPSΔ15 und pPSΔ85 der Fall ist (Abb.27, Spur 2 und 3). Das heißt, die rechte und die linke Domäne der zweifach symmetrischen Nukleotidsequenz (Abb.25 und 29) ist für einen intakten Replikationsorigin von RSF1010 absolut erforderlich. Beide Domänen enthalten wiederum jeweils zwei Palindrom-artige Sequenzen (Abb.25 und 29). Einzelstränge, die diese Palindrom-artigen Sequenzen tragen, neigen dazu in dieser Region Kompressionen zu zeigen, sogar unter denaturierenden Bedingungen in einem Sequenzgel bei 50°C (siehe Abb.28). Erst bei 70°C sind diese thermodynamisch stabilen Sekundärstrukturen in einem Sequenzgel elektrophoretisch auflösbar.

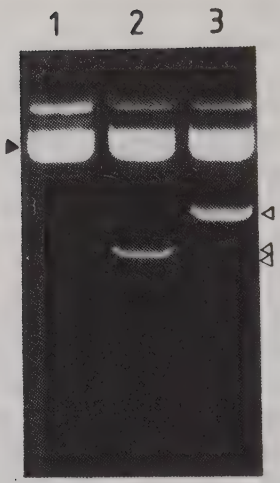


Abb. 27

Plasmid-Gehalt von E.coli C600[pMMB2]-Zellen, die mit verschiedenen in vitro konstruierten oriV-Plasmiden transformiert wurden. Die aus einer Übernachtkultur (5 ml) nach der Methode von Holmes und Quigley (47) isolierte Plasmid-DNA wurde in 60 µl TE-Puffer gelöst und ein Teil davon (5 µl) durch Elektrophorese in einem 1%igen TB-Agarosegel analysiert. Der ausgefüllte Pfeil zeigt auf die ccc-DNA des 10.1 kb großen Helfer-Plasmids pMMB2, das die Informationen für die Replikationsproteine RepA, B und C von RSF1010 enthält. Die leeren Pfeile zeigen auf die ccc-DNA's der kleineren oriV-tragenden Satelliten-Plasmide.
Spuren: 1, C600[pMMB2,pPSΔ55]; 2, C600[pMMB2,pPSΔ85]; 3, C600[pMMB2,pPSΔ15].

Die dritte Domäne, die für einen aktiven Origin essentiell ist, sind die drei perfekt konservierten Sequenzeinheiten (Nukleotide 403 bis 466) (Abb.25) von denen man weiß, daß dort mit großer Wahrscheinlichkeit Sequenz-spezifisch das RepC-Protein bindet (11).

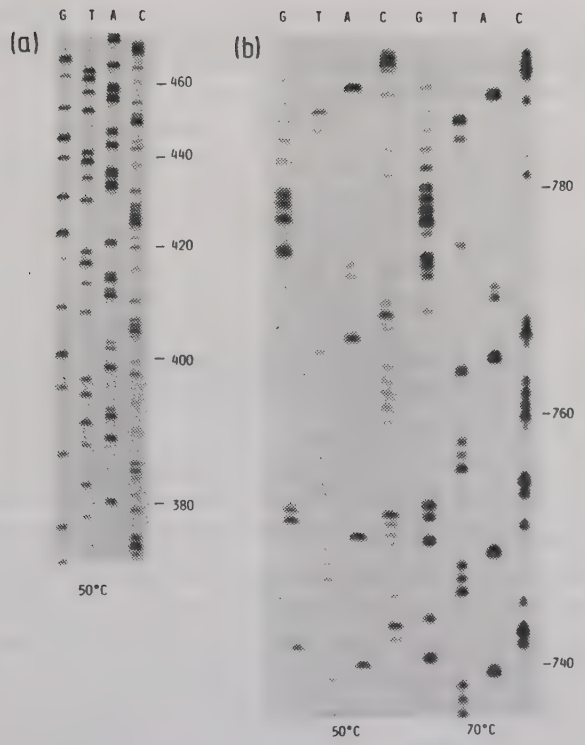


Abb. 28

Ausgewählte Sequenz-Autoradiogramme der oriV-Region. Als Matrize für die nach der Kettenabbruchmethode erzeugten Oligonukleotide wurden folgende Phagen-Einzelstränge benutzt: (a) M13oriV 9Δ60, (b, 50 °C) M13oriV 9Δ55, und (b, 70 °C) M13oriV Δ81. Die in Gegenwart von dATP[α-^{35}S] erzeugten Oligonukleotide wurden bei 25W für 90 Min. in einem 6%igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde -wie angezeigt- entweder bei 50 ° oder 70 ° C durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel fixiert, getrocknet und autoradiographiert. Die Zahlenwerte geben Nukleotid-Positionen an und beziehen sich auf das Numerierungssystem in Abb.25. In (a) ist die Region zwischen den Nukleotid-Positionen 381 und 466 wiedergegeben, in der sich die vier 20 bp-langen "direct repeats" befinden. In (b) ist die DNA-Region zwischen den Nukleotid-Positionen 730 und 793 gezeigt. In dieser Region befinden sich zwei palindromartige Sequen-

zen (siehe Abb.25), die sich bei 50° C durch eine Kompression der Gelbanden bemerkbar machen. Bei 70° C wurden diese durch Sekundärstrukturbildung verursachten Kompressionen während des Elektrophoreselaufs unterdrückt und ergeben ein lesbares Bandenmuster.

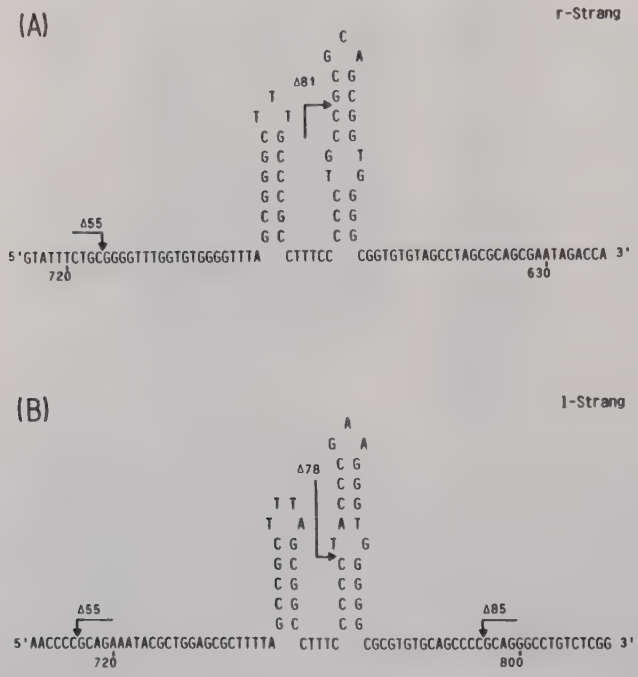


Abb. 29

Potentielle Sekundärstruktur der beiden sich zueinander Palindrom-artig verhaltenden oriV-Domänen. Die Zahlen beziehen sich auf das in Abb.25 verwendete Numerierungssystem. Die Pfeile markieren die Endpunkte von Deletionen, die zur Eingrenzung der minimalen oriV-Region benutzt wurden.

5. DISKUSSION

Um eine bessere Basis für das Verstehen der RSF1010-Replikation sowie deren Regulation zu bekommen, wurden die Replikationsdeterminanten zunächst einer strukturellen Analyse auf der Ebene der DNA unterworfen. In der Abb.30 sind die Ergebnisse aus der DNA-Sequenzbestimmung dieser Arbeit zusammengefaßt, die durch weitere Daten ergänzt wurden (Scherzinger, Haring, Scholz und Bagdasarian). Das Replikationsgen repB ist von der oriV-Region durch eine 1667 bp-große Region getrennt. Nach dem offenen Leserahmen von repB folgt eine 511 bp-lange Nukleotidsequenz, an die sich die Replikationsgene repA und C anschließen. Dabei überlappt das Ende des repA-Gens mit dem Anfang des repC-Gens in einem Bereich von 14 Nukleotiden. In dem überlappenden Bereich weist die Startregion des repC-Gens besondere strukturelle Merkmale auf (siehe Abb. 13), die wahrscheinlich auf die Translation des repC-Gens reduzierend wirken (siehe Abb.15).

Weitere DNA-Sequenzdaten ergaben offene Leserahmen, die die Information für ein 15 kDa- und ein 78 kDa-Protein tragen. Diese Translationsprodukte konnten inzwischen identifiziert werden. Das Gen für das 78 kDa-Protein befindet sich im gleichen Leserahmen wie das repB-Gen, nur daß es 1158 Nukleotide weiter aufwärts anfängt. Aufwärts gelegen vom repB-Gen ist das Gen für das 15 kDa-Protein zu finden, das mit einer Länge von 414 Nukleotiden einen anderen offenen Leserahmen aufweist als das repB-Gen und das Gen für das 78 kDa-Protein. Das Ende des Leserahmens für das 15 kDa-Protein überlappt dabei mit dem Anfang des repB-Gens in einem Bereich von 4 Nukleotiden. Mit seinen überlappenden Genen ähnelt das Plasmid RSF1010 stark dem Phagen øX174 mit seinen überlappenden Genen A, A* und B (107). Da das 78 kDa-Protein die Aminosäuresequenz des RepB-Proteins in sich birgt, wird es unter den möglichen Funktionen auch die Funktion des RepB-Proteins besitzen. Genetische Komplementations- und Promotor-Fusionsdaten (Bagdasarian und Scholz, unveröffentlichte Daten) deuten daraufhin, daß das 78 kDa-Protein re-

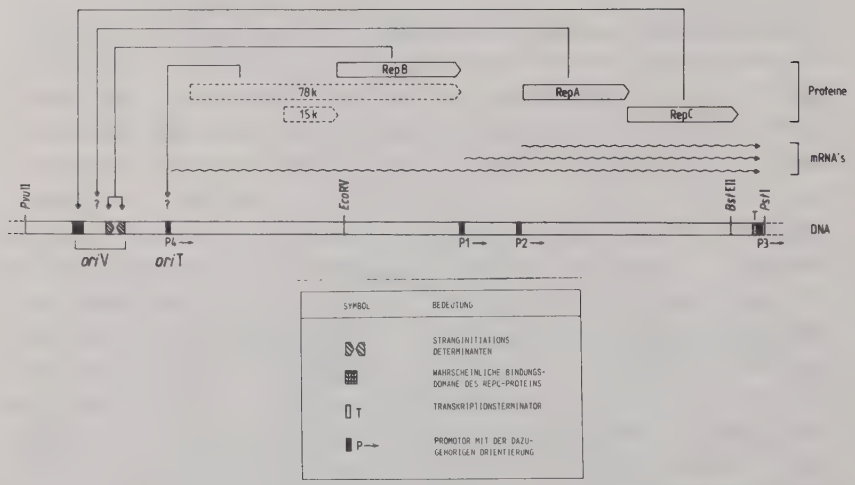


Abb. 30

Strukturelle und funktionelle Aspekte des minimalen RSF1010-Replikons. Gezeigt ist das 5827 bp-große PvuII/PstI-Fragment von RSF1010, auf dem sich die für eine stabile Replikation in vielen verschiedenen gram-negativen Bakterien notwendige Informationen befinden. Die sich aus der gezeigten Promotor/Terminator-Konstellation ergebenden Transkripte sind durch wellenförmige Linien wiedergegeben. Sie enthalten die Information für mindestens 5 Proteine, von denen die Replikationsproteine RepA, B und C gereinigt wurden und durch eine N- und C-terminale Aminosäuresequenzanalyse eindeutig den entsprechenden offenen Leserahmen der Nukleotidsequenz zugeordnet werden konnten. RSF1010-spezifische Proteine mit Molekularmassen von ca. 78.000 und 15.000 konnten durch elektrophoretische Analyse von Zell-Lysaten nachgewiesen werden (Scherzinger und Scholz) und entsprechen mit großer Wahrscheinlichkeit den durch die gestrichelten Balken wiedergegebenen offenen Leserahmen. Das Ausmaß der minimalen Region, die für die Initiation der bidirektionalen Replikation benötigt wird, ist durch eine Klammer angegeben. Ebenfalls gezeigt ist die ungefähre Position von oriT, der Region, in welcher die konjugale Transferreplikation initiiert wird (3,9,90). Experimentell nachgewiesene sowie hypothetische (mit einem Fragezeichen versehene) Wirkungsorte der verschiedenen Proteine sind durch eine Pfeilverbindung vom Protein zum Zielort angezeigt. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

primierend auf die P4-Promotor-Aktivität wirkt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß das 78 kDa-Protein sowie das RepB-Protein in sehr geringen Mengen in der Zelle vorkommen (Scherzinger, unveröffentlichte Daten), so daß das vom P4-Promotor abwärts gelegene Operon wahrscheinlich autoreguliert ist.

Nach der möglichen Promotor- und Transkriptionsterminator-Organisation des RSF1010-Replikons können drei Transkripte entstehen. Wie in der Abb.30 zu sehen ist, könnte eine mRNA entstehen, die dem transkriptiven Strang vom P4-Promotor bis zum Transkriptionsterminator komplementär ist. Bei den anderen beiden möglichen mRNA's würde der Start in der Intergenregion mit den Promotoren P1 und P2 liegen, wobei auch hier das Ende festgelegt ist durch den Transkriptionsterminator. Dabei könnte der Intergenregion eine mögliche Rolle bei der Regulation auf Translationsebene zukommen. Durch die Anhäufung von Initiations/Terminations-Signalen in dieser Region (siehe Abb.16) findet wahrscheinlich ein Wegfangen der Ribosomen statt, wodurch schließlich weniger Ribosomen für die Replikationsgene zur Verfügung stehen.

Mit Hilfe eines RSF1010-spezifischen in vivo- und in vitro-Systems konnte der Replikationsorigin von RSF1010 auf 395 bp (siehe Abb.25, Nukleotide 399 bis 796) eingeengt werden. Die eine Hälfte des Minimalbereichs zeichnet sich durch vier gerichtete 20 bp-lange Sequenzeinheiten aus (siehe Abb.25, Nukleotide 403 bis 466), die durch zwei Basenpaare voneinander getrennt sind. DNA-Protein-Bindungsstudien ergaben, daß das RepC-Protein von RSF1010 wahrscheinlich bevorzugt an diesen Sequenzeinheiten bindet (11).Dabei übt das RepC-Protein eine positive Wirkung gegenüber der RSF1010-Replikation aus. Denn eine künstliche Erhöhung des Konzentrationsspiegels an RepC-Protein in der Zelle verursacht eine Steigerung der Kopienzahl des RSF1010-Plasmids (11).

Die zweite Hälfte der Originsequenz beherbergt eine Region von 152 Basenpaaren (siehe Abb. 25 und 29, Nukleotide 642 bis 793), die eine ausgeprägte Zweifach-Symmetrie aufweist.

Detaillierte in vitro-Replikationsstudien unter Verwendung von einzel- und doppelsträngigen DNA-Substraten (Daten aus dieser Arbeit und Daten von Scherzinger und Scholz) ergaben, daß in dieser Region die DNA-Synthese in beide Richtungen gestartet wird. Das heißt, jeder Strang der Duplex-DNA enthält eine eigene Initiationsstelle für die komplementäre Strang-Synthese. Diese Domänen, als oriR und oriL bezeichnet, sind jeweils zwischen den Nukleotiden 642 und 705 bzw. 730 und 793 lokalisiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen an doppelsträngiger DNA sind für die Initiation der DNA-Synthese an einzelsträngiger DNA, die die oriR- bzw. oriL-Domäne trägt, die beiden RSF1010-Replikationsproteine A und C nicht mehr erforderlich (115). Das heißt, daß dem RepB-Protein eine besondere Funktion bei der Synthese eines Primer-Moleküls zukommt. Erst wenn dieser Primer gesetzt wurde, kann die DNA-Polymerase III den komplementären Strang synthetisieren.

Aus dem Plasmid R1162 konnte vor kurzem ein Fragment von 580 bp isoliert werden, das in cis für einen aktiven oriV benötigt wird, eine Inkompatibilitätsdeterminante trägt und an der Kontrolle der Kopiezahl beteiligt ist (36,37). Ein Vergleich des 580 bp-großen Fragments von R1162 mit dem 1043 bp großen PvuII/HinfI-Fragment (bezogen auf die Nukleotide 234 bis 828, siehe Abb.25) zeigt eine fast vollständige Homologie. Die Abweichungen zwischen beiden Nukleotidsequenzen betreffen 13 Nukleotide. Der Phänotyp Inkompatibilität wird wahrscheinlich durch die vier gerichteten DNA-Sequenzeinheiten zum Ausdruck gebracht, die sich auf dem 580 bp-großen Fragment von R1162 befinden. Vermutlich kontrollieren die sich wiederholenden DNA-Sequenzen die Replikation negativ, indem sie das Plasmid-kodierte Initiatorprotein titrieren, das für die Plasmid-Replikation essentiell ist.

Über die genaue Funktion des RepA-Proteins während der Initiation der RSF1010-Replikation ist wenig bekannt, außer daß das Protein eine DNA-abhängige ATP'ase-Aktivität (Scherzinger, unveröffentlichte Daten) ausübt. Ferner besitzt das

RepA-Protein partielle Homologien mit dem P22-Gen12-Protein und dieses wiederum mit dem dnaB-Protein (siehe unter Ergebnisse 4.5.).

Wie schon oben erwähnt, bindet das RepC-Protein bevorzugt an ein kleines DNA-Fragment, in dem die 4 gerichteten Sequenzeinheiten der oriV-Region lokalisiert sind. Zusätzlich zu der spezifischen DNA-Bindung konnte auch eine unspezifische DNA-Bindung des RepC-Proteins nachgewiesen werden (Scherzinger, unveröffentlichte Daten). Außerdem zeigt das RepC-Protein gewisse Homologie 1.) mit dem N-Terminus von DNA-unspezifisch bindenden Proteinen (siehe Abb.23) und 2.) mit der DNA-spezifisch bindenden Domäne von regulatorischen Proteinen (siehe Abb.22). Da das RepC-Protein in der nativen Form wahrscheinlich als Dimer vorliegt (10), wird mindestens eine weitere Domäne neben den oben genannten für eine Protein-Protein-Interaktion existieren.

Aufgrund der Möglichkeit, daß das RepC-Protein aus zwei funktionellen mit der DNA in Interaktion tretenden Domänen bestehen kann, lassen sich verschiedene Konfigurationszustände des RepC-Proteins (siehe Abb.31) in Anlehnung an die Modelle des lac-Repressors erstellen (116,117). Dabei geht man davon aus, daß der Mechanismus für das Finden der gerichteten sich wiederholenden Nukleotidsequenzen (Iterons) durch das RepC-Protein (Initiator) unterteilt ist in zwei Schritte. Im ersten Schritt wird in einer durch Diffusion kontrollierten Reaktion ein Komplex zwischen der DNA und dem Initiator gebildet. Der Kontakt der DNA mit dem Initiator findet dabei in einer Region statt, in der nicht die Iterons lokalisiert sind. Der DNA-unspezifisch gebundene Initiator gleitet dann in einem eindimensionalen Diffusionsprozess an der DNA entlang. In diesem Zustand besitzt der Initiator die nicht-spezifische DNA-bindende Konfiguration (D-bindende Form), wobei hier die Bindung des Initiators an die DNA auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. An dieser Wechselwirkung könnte die NH_2-terminale Domäne des RepC-Proteins beteiligt sein. Nach einer Serie von intramolekularen

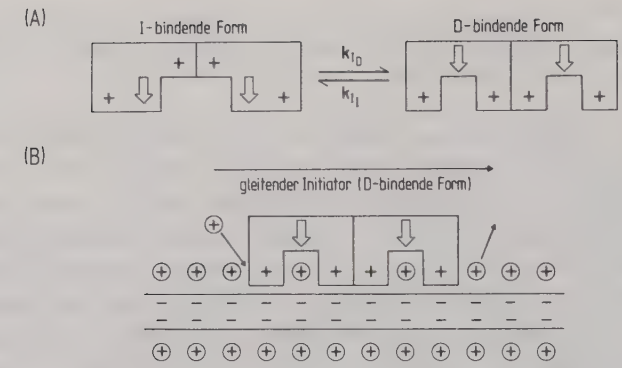


Abb. 31

Darstellung der Iteron-bindenden und der die DNA unspezifisch bindenden Form des RepC-Initiatorproteins (ähnlich dem Modell des lac-Repressors (116,117)). Die I-bindende Form (oben links) interagiert spezifisch mit Iteron-Sequenzen (direct repeats) über die bihelikale Einheit (offene Pfeile) in Form von Wasserstoffbrückenbindungen. Die D-bindende Form (oben rechts) steht über positiv geladene Domänen elektrostatisch mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA in Kontakt. In dieser Situation liegt die bihelikale Einheit in einem zurückgezogenen Zustand vor. Beide Konformationszustände können ineinander übergehen. Das untere Modell zeigt die unspezifisch bindende Form in einem Gleit-Prozeß entlang der DNA, bei dem die DNA-gebundenen Gegenionen verdrängt werden. Weitere Anmerkungen stehen im Text.

(innerhalb der Domäne des Moleküls) Dissoziations- und Assoziationsschritten, die den einzelnen Gleitvorgängen zwischengelagert sind, findet eine Lokalisierung der Zielstelle statt. In dieser Situation liegt der Initiator in einer spezifischen DNA-bindenden Konfiguration vor (I-bindende Form), in der der Initiator durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Iterons wechselwirkt. Diese Eigenschaften könnte man der Domäne des RepC-Proteins zuschreiben, in der die Sekundärstruktur α_1-Helix, ß-turn und α_2-Helix vorkommt (siehe Abb.22). Bei bekannten regulatorischen Proteinen nehmen diese Sekundärstrukturen an der spezifischen DNA-Protein-Wechselwirkung teil (siehe Abb.32).

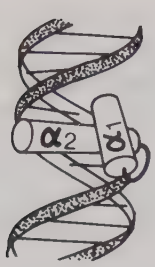


Abb. 32

Modell der Interaktion eines sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteins mit der Signalsequenz einer rechts-gewundenen DNA-Helix der B-Form. Gezeigt ist die bihelikale Einheit eines Protein-Monomers, bestehend aus α_1-Helix, ß-Knick und α_2-Helix. Dabei liegt die α_2-Helix in der großen Furche der DNA und wechselwirkt über Wasserstoffbrückenbindungen spezifisch mit den stickstoffhaltigen Basen der DNA. Die α_1-Helix steht wahrscheinlich mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA in Kontakt. Die bihelikale Einheit wurde bei dem λ CI-Repressor, dem λ Cro-Protein und dem CAP-Protein nachgewiesen und scheint als konservierte Domäne in allen sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen enthalten zu sein (111).

Ein Homologievergleich auf Aminosäure-Ebene der Replikationsproteine von RSF1010 mit bekannten Replikationsproteinen ergab keine signifikante Homologie (siehe Tabelle 8). Unter den vergleichenden Replikationsproteinen befanden sich auch Plasmid-kodierte Replikationsproteine, die Sequenz-spezifisch mit dem vegetativen Replikationsorigin in Kontakt treten. Das heißt, diese Proteine sind von der Aminosäuresequenz individuell auf die vegetative Replikation ihrer DNA abgestimmt.

Obwohl keine signifikante Aminosäuresequenz-Homologien gefunden wurden, können jedoch dreidimensionale Strukturen einzelner Domänen unter den verschiedenen Replikationsproteinen identisch sein. Für Plasmid-kodierte Replikationsproteine, die mit gerichteten, sich wiederholenden Sequenzeinheiten interagieren, können das Domänen sein, wie sie oben beschrieben wurden. Ein gutes Beispiel für Unterschiede in der Aminosäuresequenz und Gleichheit in der dreidimensiona-

len Struktur gibt ein Vergleich von Myoglobin und Hämoglobin, bei denen weniger als 10% der Aminosäurereste identisch sind, obwohl die dreidimensionalen Strukturen fast gleich aussehen (118).

LITERATURVERZEICHNIS

1. Guerry, P., van Embden, J. & Falkow, S. (1974): Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. J. Bact. 117, 619-630.

2. Barth, P. & Grinter, N.J. (1974): Comparison of the deoxyribonucleic acid molecular weights and homologies of plasmids conferring linked resistance to streptomycin and sulphonamides. J. Bact. 120, 618-630.

3. Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., Lurz, R., Nordheim, A., Frey, J. & Timmis, K.N. (1982): Molecular and functional analysis of the broad host range plasmid RSF 1010 and construction of vectors for gene cloning in gram-negative bacteria. In: Bacterial drug resistance, ed. Mitsuhashi,S. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, pp.183-197.

4. Bagdasarian, M., Bagdasarion, M.M., Coleman, S. & Timmis, K.N. (1979): New vector plasmids for cloning in Pseudomonas. In: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, eds. Timmis,K.N., Pühler, A. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp.411-422.

5. Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M. & Timmis, K.N. (1981): Manipulation of degradative genes of soil bacteria. In: Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds, eds. Hütter,R., Leisinger,T. Academic Press, London, pp.109-130.

6. Scholz, P., Haring, V., Scherzinger, E., Lurz, R., Bagdasarian, M.M., Schuster, H. & Bagdasarian, M. (1985): Replication determinants of the broad host-range plasmid RSF1010. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A., Hollaender,A. Plenum Publ. Corp., pp.243-259.

7. Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, R., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M. & Timmis, K.N. (1981): Specific purpose cloning vectors. II. Broad host range, high copy number RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in Pseudomonas. Gene, 16, 237-247.

8. Rubens, C., Heffron, F. & Falkow, S. (1976): Transposition of a plasmid deoxyribonucleic acid sequence that mediates ampicillin resistance: Independence from host rec functions and orientation of insertion. J. Bact. 128, 425-435.

9. Nordheim, A., Hashimoto-Gotoh, T. & Timmis, K.N. (1980): Location of two relaxation nick sites in R6K and single sites in pSC101 and RSF1010 close to origins of vegetative replication: implication for conjugal transfer of plasmid DNA. J. Bact. 144, 923-932.

10. Scherzinger, E., Bagdasarian, M.M., Scholz, P., Lurz, R., Rückert, B. & Bagdasarian, M. (1984): Replication of the broad host range plasmid RSF1010: Requirement for three plasmid-encoded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 654-658.

11. Haring, V., Scholz, P., Scherzinger, E., Frey, J., Derbyshire, K., Hatfull, G., Willets, N.S. & Bagdasarian, M. (1985): Protein RepC involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6090-6094.

12. de Graaf, J., Crosa, J.H., Heffron, F. & Falkow, S. (1978): Replication of the non-conjugative plasmid RSF1010 in Escherichia coli K12. J. Bact. 134, 1117-1122.

13. Bagdasarian, M. & Timmis, K.N. (1982): Host:vector systems for gene cloning in Pseudomonas. Curr. Tob. Microbiol. Immunol. 96, 47-67.

14. Frey, J., Bagdasarian, M., Feiss, D., Franklin, F.C.H., & Deshusses, J. (1983): Stable cosmid vectors that enable the introduction of cloned fragments into a wide range of gram-negative bacteria. Gene 24, 299-308.

15. Bagdasarian, M.M., Amann, E., Lurz, R., Rückert, B. & Bagdasarian, M. (1983): Activity of the bybrid trp-lac(tac) promoter of Escherichia coli in Pseudomonas putida. Construction of broad-host-range controlled-expression vectors. Gene 26, 273-282.

16. Nordström, K. (1985): Control of plasmid replication: Theoretical considerations and practical solutions. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A., Plenum Publ. Corp., pp. 189-214.

17. Matsubara, K. (1976): Genetic structure and regulation of replication of plasmid λdv. J. Mol. Biol. 102, 427-439.

18. Nijkamp, H.J.J., van Gemen, B., Hakkaart, M.J.J., van Putten, A.J. & Veltkamp, E. (1985): Stable maintenance of plasmid ClоDF13: Structural and functional relationships between replication control, partitioning and incompatibility. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A., Plenum Publ. Corp., pp.283-298.

19. Kumar, C.C. & Novick, R.P. (1985): Plasmid pT181 replication is regulated by two countertranscripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 638-642.

20. Polisky, B., Tamm, J. & Fitzwater, T. (1985): Construction of ColEI RNA1 mutants and analysis of their function in vivo. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski, D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender, A., Plenum Publ. Corp., pp.321-333.

21. Lacatena, R.M., Banner, D.W., Castagnoli, L. & Cesareni, G. (1984): Control of initiation of pMB1 replication: purified Rop protein and RNAI affect primer formation in vitro. Cell 37, 1009-1014.

22. Womble, D.D., Dong, X., Wu, R.P., Luckow, V.A., Martinez, A.F. & Rownd, R.H. (1984): IncFII plasmid incompatibility product and its target are both RNA transcripts. J. Bacteriol. 160, 28-35.

23. Womble, D.D., Dong, X., Luckow, V.A., Wu, R.P. & Rownd, R.H. (1985): Analysis of the individual regulatory components of the IncFII plasmid replication control system. J. Bacteriol. 161, 534-543.

24. Stalker, M.D., Thomas, C.M. & Helinski, D. (1981): Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Mol. Gen. Genet. 181, 8-12.

25. Smith, C.A. & Thomas, C.M. (1985): Comparison of the nucleotide sequence of the vegetative replication origins of the broad host range IncP plasmids R751 and RK2 reveals conserved features of probable functional importance. Nucl. Acids Res. 13, 557-572.

26. Stalker, D.M., Kolter, R. & Helinski, D.R. (1982): Plasmid R6K DNA replication. I. Complete nucleotide sequence of an autonomously replicating segment. J. Mol. Biol. 161, 33-34.

27. Kolter, R. & Helinski, D.R. (1982): Plasmid R6K DNA replication. II. Direct nucleotide sequence repeats are required for an active γ-origin. J. Mol. Biol. 161, 45-56.

28. McEachern, M.J., Filutowicz, M. & Helinski, D.R. (1985): Mutations in direct repeat sequences and in a conserved sequence adjacent to the repeats results in a defective replication origin in plasmid R6K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1480-1484.

29. Kelly, W. & Bastia, D. (1985): Replication initiator protein of plasmid R6K autoregulates its own synthesis at the transcriptional step. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2574-2578.

30. Abeles, A.L., Snyder, K.M. & Chattoraj, D.K. (1984): P1 plasmid replication: replicon structure. J. Mol.

Biol. 173, 307-324.

31. Chattoraj, D., Cordes, K. & Abeles, A. (1984): Plasmid P1 replication: negative control by repeated DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6456-6460.

32. Chattoraj, D.K., Snyder, K.M. & Abeles, A.L. (1985): P1 plasmid replication: multiple functions of RepA protein at the origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2588-2592.

33. Vocke, C. & Bastia, D. (1983): Primary structure of the essential replicon of the plasmid pSC101. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6557-6561.

34. Yamaguchi, K. & Yamaguchi, M. (1984): The replication origin of pSC101: the nucleotide sequence and replication functions of the ori region. Gene 29, 211-219.

35. Linder, P., Churchward, G., Guixian, X.,Yi-Yi,Y. & Caro, L. (1985): An essential replication gene, repA, of plasmid pSC101 is autoregulated. J. Mol. Biol. 181, 383-393.

36. Lin, L. & Meyer, R.J. (1984): Nucleotide sequence and functional properties of DNA encoding incompatibility in the broad host-range plasmid R1162. Mol. Gen. Genet. 194, 423-431.

37. Meyer, R.J., Lin, L., Kim, K. & Brasch, M.A. (1985): Broad host-range plasmid R1162: Replication, incompatibility, and copy-number control. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A., Plenum Publ. Corp., pp.173-188.

38. Rownd, R.H., Womble, D.D., Dong, X., Luckow, V.A. & Wu, R.P. (1985): Incompatibility and IncFII plasmid replication control. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A., Plenum Publ. Corp., pp.335-354.

39. Novick, R.P., Projan, S.J., Kumar, C.C., Carleton, S., Gruss, A., Highlander, S.K. & Kornblum, J. (1985): Replication control for pT181, an indirectly regulated plasmid. In: Plasmid in Bacteria, eds. Heliski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A., Plenum Publ. Corp., pp.299-320.

40. Thomas, C.M. & Hussain, A.A.K. (1984): The korB gene of broad host range plasmid RK2 is a major copy number control element which may act together with trfB by limiting trfA expression. EMBO J. 3, 1513-1519.

41. Diaz, R. & Staudenbauer, W.L. (1982): Replication of the broad host range plasmid RSF1010 in cell-free extracts of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Nucl. Acids Res. 10, 4687-4702.

42. Bachman, B.J. (1972): Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. Bact. Rev. 36, 525-557.

43. Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix,D. (1969): A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41, 459-472.

44. Figurski, D.H., Young, C., Schreiner, H.C., Pohlman, R.F., Bechhofer, D.H., Prince, A.S. & D'Amico, T.F. (1985): Genetic interactions of broad host-range plasmid RK2: Evidence for a complex replication regulon. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender, A., Plenum Publ. Corp., pp.227-241.

45. Messing, J. (1983): New M13 vectors for cloning. In: Methods in Enzymology, Vol.101, eds. Wu,R. Grosman,L. & Moldave, K., Academic Press, New York, pp.20-78.

46. Clewell, D.B. & Helinski, D.R. (1969): Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166.

47. Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197.

48. Schleicher & Schuell (Keene, USA): ELUTIP-d, rapid method for purification and concentration of DNA, No.204, August 1982.

49. Legerski, R.J., Hodnett, J.L. & Gray, Jr. H.B. (1978): Extra-cellular nucleases of Pseudomonas Bal31. III. Use of the double-strand deoxyribonuclease activity as the basis of a convenient method for the mapping of fragments of DNA produced by cleavage with restriction enzymes. Nucl. Acids Res. 5, 1445-1464.

50. Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982): Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

51. Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarty, B.J., Goodman, H.M. & Boyer, H.W. (1975): Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3310-3314.

52. Daniels, D.L. & Blattner, F.R. (1982): Lambda DNA-

location of recognition sequences. New England Biolabs catalog 1982-1983, pp.58-59.

53. Kushner, S.R. (1978): An improved method for the transformation of Escherichia coli with ColE1 derived plasmids. In: Genetic Engineering, eds. Boyer,H.W., Nicosia,S., Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp.17-23.

54. Poncz, M., Solowiejczyk, D., Ballantine, M., Schwartz, E. & Surrey, S. (1982): "Nonrandom" DNA sequence analysis in bacteriophage M13 by the dideoxy chain-termination method. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4298-4302.

55. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

56. Biggin, M.D., Gibson, T.J. & Hong, G.F. (1983): Buffer gradient gels and 35-S label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965.

57. Garoff, H. & Ansorge, W. (1981): Improvements of DNA sequencing gels. Anal. Biochem. 115, 450-457.

58. LKB (Bromma, Schweden): Instruction Manual, LKB 2010-001 Macrophor Electrophorese Unit and LKB 2010-100 Macromould Gel Casting Unit, No.90016984, May 1983.

59. Isono, K. (1984): A computer-program package for storing and retrieving DNA, RNA and protein sequence data. Nucl. Acids Res. 12, 101-112.

60. Studier, F.W. (1973): Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79, 237-248.

61. Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P. & van Alphen, P. (1975): Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of Escherichia coli K12 into four bands. FEBS Lett. 58, 254-258.

62. Wittmann-Liebold, B. & Ashman, K. (1985): On-line detection of amino acid derivatives released by automatic Edman degradation of polypeptides. In: Modern Methods in Protein Chemistry, ed. Tschesche, Walter de Gruyter, Berlin, New York (in press).

63. Ashman, K. & Bosserhoff, A. (1985): Amino acid analysis by high performance liquid chromatography and precolumn derivatisation. In: Modern Methods in Protein Chemistry, ed. Tschesche, Walter de Gruyter, Berlin, New York (in press).

64. Durrum Instrument Corp. (Palo Alto, California): Operation and maintenance manual. Durrum Amino Acid Model D-500, January 1972.

65. George, D.C., Orcutt, B.C., Dayhoff, M.O. & Barker, W.C. (1982): National Biomedical Research Foundation, protein sequence data-base. NBR report 820502-08710, program version 1.0. Georgetown University Medical Center, Washington, D.C.

66. Orcutt, B.C., Dayhoff, M.O. & Barker, W.C. (1982): Protein sequence data-base. NBR report 820501-08710 program version 1.0. National Biomedical Research Foundation, Georgetown University Medical Center, Washington, D.C.

67. Barker, W.C., Ketcham, L.K. & Dayhoff, M.O. (1978): A comprehensive examination of protein sequences for evidence of internal gene duplication. J. Mol. Evol. 10, 265-281.

68. Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157, 105-132.

69. Rawlings, N., Ashman, K. & Wittmann-Liebold, B. (1983): Computerised version of the Chou and Fasman protein secondary structure predictive method. Int. J. Pept. Prot. Res. 22, 515-524.

70. Staudenbauer, W.L. (1976): Replication of small plasmids in extracts of Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 145, 273-280.

71. Conrad, S.E. & Campbell, J. (1979): Characterization of an improved in vitro DNA replication system for Escherichia coli plasmids. Nucl. Acids Res. 6, 3289-3303.

72. Schuster, H., Mikolajczyk, M., Rohrschneider, J. & Geschke, B. (1975): øX174 DNA-dependent DNA synthesis in vitro: Requirement for P1 ban protein in dnaB mutant extracts of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3907-3911.

73. Spector, T. (1978): Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. Anal. Biochem. 86, 142-146.

74. Boehringer (Mannheim, Federal Republic of Germany): biochemica-dienst, Nr.59, September 1984.

75. Tsugita, A. & van den Broek, R. (1980) In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis, ed. C.Birr, Elsevier/North Holland, pp.359-369.

76. Kozak, M. (1983): Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microb. Rev. 47, 1-45.

77. Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedbring, S., Swebilius Singer, B. & Stormo, G. (1981): Translational initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Microb. 35, 365-403.

78. Baughman, G. & Nomura, M. (1984): Translational regulation of the L11 ribosomal protein operon of Escherichia coli: Analysis of the mRNA target site using oligonucleotide-directed mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5389-5393.

79. Shaw, W.V., Brenner, D.G., Le Grice, S.F.J., Skinner, S.E. & Hawkins, A.R. (1985): Chloramphenicol methyltransferase gene of staphylococcal plasmid pC221. FEBS Lett. 179, 101-106.

80. Thireos, G., Penn, M.D. & Greer, H. (1984): 5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5096-5100.

81. Kozak, M. (1984): Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. Nucl. Acids Res. 12, 3873-3893.

82. Johansen, H., Schümperli, D. & Rosenberg, M. (1984): Affecting gene expression by altering the length and sequence of the 5' leader. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7698-7702.

83. Rosenberg, M. & Court, D. (1979): Regulatory sequences involved in promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Gen. 13, 319-353.

84. Hawley, D.K. & McClure, W.R. (1983): Compilation and analysis of Escherichia coli promotor sequences. Nucl. Acids Res. 11, 2237-2255.

85. Brosius, J., Erfle, M. & Storella, J. (1985): Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. J. Biol. Chem. 260, 3539-3541.

86. Mulligan, M.E., Brosius, J. & McClure, W.R. (1985): Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of Escherichia coli RNA polymerase at the tac promotor. J. Biol. Chem. 260, 3529-3538.

87. Tinoco, I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M. & Gralla, J. (1973): Improved estimation of secondary structure in ribo-

nucleic acid. Nature, New Biol. 246, 40-41.

88. Borer, P.N., Dengler, B., Tinoco, I. & Uhlenbeck, O.C. (1974): Stability of ribonucleic acid double-stranded helices. J. Mol. Biol. 86, 843-853.

89. Platt, T. & Bear, T.G. (1984): Role of RNA polymerase ρ factor and ribosomes in transcription termination. In: Gene Function in Prokaryotes, eds. Beckwith,J., Davies,J. & Gallant, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

90. Willetts, N. & Wilkins, B. (1984): Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. Bact. Rev. 48, 24-41.

91. Normore, W.M. (1976): Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, ed. Fasman,G.D., 3rd ed., pp.65-235, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.

92. Banker, G.A. & Cotman, C.W. (1972): Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulphate complexes by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 274, 5856-5861.

93. Smith, C.A. & Thomas, C.M. (1984): Nucleotide sequence of the trfA gene of broad host-range plasmid RK2. J. Mol. Biol. 175, 251-262.

94. Horinouchi, S. & Weisblum, B. (1982): Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. J. Bacteriol. 150, 815-825.

95. National Biomedical Research Foundation (Georgetown University Medical Center, Washington, D.C.): NBRF-PIR Protein Sequence Database. No.1, January 1985.

96. Novick, R.P., Adler, G.K., Majumder, S., Khan, S.A., Carleton, S., Rosenblum, W.D. & Jordanescu, S. (1982): Coding sequence for the pT181 repC product: a plasmid-coded protein uniquely required for replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4108-4112.

97. Nakayama, N., Arai, N. Bond, M.W., Kaziro, Y. & Arai, K. (1984): Nucleotide sequence of dnaB and the primary structure of the dnaB protein from Escherichiacoli. J. Biol. Chem. 259, 97-101.

98. Germino, J. & Bastia, D. (1982): Primary structure of the replication initiation protein of plasmid R6K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5475-5479.

99. Backhaus, H. & Petri, J.B. (1984): Sequence analysis of a region from the early right operon in phage P22

including the replication genes 18 and 12. Gene, 32, 289-303.

100. Burgess, A.W., Ponnuswamy, P.K. & Scheraga, H.A. (1974): Analysis of conformations of amino acids residues and prediction of backbone topography in proteins. Israel J. Chem. 12, 239-286.

101. Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1978): Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 47, 45-148.

102. Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1979): Prediction of ß-forms. Biophys. J. 26, 367-384.

103. Nagano, K. (1977): Triplet information in helix prediction applied to the analysis of supersecondary structures. J. Mol. Biol. 109, 251-274.

104. Robson, B. & Suzuki, E. (1976): Conformational properties of amino acid residues in globular proteins. J. Mol. Biol. 107, 327-356.

105. Dayhoff, M.O. (1978) in: Atlas of Protein Sequence and Structure, vol.5, suppl.3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.

106. Kornberg, A. (1980): DNA Replication. W.H.Freeman and Co., San Francisco.

107. Kornberg, A. (1982): Supplement to DNA Replication. W.H.Freeman and Co., San Francisco.

108. Wickner, S. (1984): Oligonucleotide synthesis by Escherichia coli dnaG primase in conjunctions with phage gene 12 protein. J. Biol. Chem. 259, 14044-14047.

109. Fuller, C.W. & Richardson, C.C. (1985): Initiation of DNA replication at the primary origin of bacteriophage T7 by purified proteins. J. Biol. Chem. 260, 3197-3206.

110. Chattoraj, D.K., Abeles, A.L. & Yarmolinsky, M.B. (1985): P1 plasmid maintenance: A paradigm of precise control. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A. Plenum Publ. Corp., pp.355-381.

111. Takeda, Y., Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F. & Matthews, B.W. (1983): DNA-binding proteins. Science 221, 1020-1026.

112. Wharton, R.P., Brown, E.L. & Ptashne, M. (1984): Substituting an α-helix switches the sequence-

specific DNA interactions of a repressor. Cell 38, 361-369.

113. Kimura, M., Kimura, J., Davie,P., Reinhardt, R. & Dijk, J. (1984): The amino acid sequence of a small DNA binding protein from the archaebacterium Sulfolobus solfataricus. FEBS Lett. 176, 176-178.

114. Murotsu, T., Tsutsui, H. & Matsubara, K. (1984): Identification of the minimal essential region for the replication origin of miniF plasmid. Mol. Gen. Genet. 196, 373-378.

115. Haring, V., Scholz, P., Lurz, R., Bagdasarian, M. & Scherzinger, E. (1985): Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010-encoded repA, repB and repC proteins. In: Plasmids in Bacteria, eds. Helinski,D.R., Cohen,S.N., Clewell,D.B., Jackson,D.A. & Hollaender,A., Plenum Publ. Corp., pp.859.

116. Winter, R.B., Berg, O.G. & von Hippel, P.H. (1981): Diffusion-driven mechanism of protein translocation on nucleic acids. 3. The Escherichia coli lac repressor-operator interaction: kinetic measurements and conclusions. Biochemistry 20, 6961-6977.

117. Berg, O.G., Winter, R.B. & von Hippel, P.H. (1982): How do genome-regulatory proteins locate their DNA target sites? TIBS, February, 52-55.

118. Dickerson, R.E. & Geis, I. (1983): Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology, 77 (Benjamin/Cummings, Menlo Park, California).

119. Weigert, M.G., Galucci, E., Lanka, E. & Garen, A. (1966): Characteristics of the genetic code in vivo. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XXXI, Cold Spring Harbor, N.Y., pp.145-150.

120. Stalker, D.M., Filutowicz, M. & Helinski, D.R. (1983): Release of initiation control by a mutational alteration in the R6K π protein required for plasmid DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5500-5504.

121. Schmidhauser, T.J., Filutowicz, M. & Helinski, D.R. (1983): Replication of derivatives of the broad host range plasmid RK2 in two distantly related bacteria. Plasmid 9, 325-330.

122. Ogawa, T., Baker, T.A., van der Ende, A. & Kornberg, A. (1985): Initiation of enzymatic replication at the origin of the Escherichia coli chromosome: Contribution of RNA polymerase and primase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3562-3566.

Lebenslauf

Name: Peter Scholz
Geburtstag, -ort: 1.4.1956, Berlin
Nationalität: deutsch

Ausbildung:

1963 Grundschule in Berlin
1969 Gymnasium in Berlin
1974 Abschluß der mittleren Reife
1974 Ausbildung bei Schering als Biologielaborant
1974 Gymnasium in Berlin
1977 Abitur

1977 Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Biologie

1979 Vorprüfung zur Diplomprüfung im Fach Biologie

1980 Einschreibung in das Fach Biochemie (Fachbereich Chemie) an der FU Berlin

1981 Entwurf, Implementierung und Test einer Optimierungsstrategie an der TU Berlin (Verfahrenstechnik) bei Herrn Prof.Dr. I.Rechenberg und an der FU Berlin (Med. Informatik) bei den Herren Prof.Dr. P.Koeppe und Dr. C.Hamann

1982 Vorprüfung zur Diplomprüfung im Fach Biochemie

1982 Durchführung der experimentellen Arbeiten für das Diplom im Fach Biologie im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, in der Abteilung von Herrn Prof.Dr. H. Schuster

1983	Diplomprüfung im Fach Biologie. Thema: Die Replikationsgene des Plasmids RSF1010 als Vertreter von Plasmiden mit einem breiten Wirtsspektrum
1983	Anrechnung des vorklinischen Medizinstudiums
1983-1985	Durchführung der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, in der Abteilung von Herrn Prof.Dr. H.Schuster